



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ACTIVIDAD PROVITAMINA A DE CAROTENOIDES  $\beta$ - $\kappa$  Y DEPOSICIÓN  
EN TEJIDOS DE RATAS

PRESENTADO POR:

DANIA EDITH MENCHACA MARTÍNEZ

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL  
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN  
BIOQUÍMICA

ASESOR DE TESIS:

DR. ENRIQUE MURILLO

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2020

---

Asesor (Dr. Enrique Murillo)

---

Jurado (Dra. Eunice Molinar)

---

Jurado (Dr. Armando Durant)

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis hijos Velkys, Dania y Derek Rivera, que son el motor en mi vida y me dan las fuerzas de seguir adelante día a día, también a mis padres Esilda Martínez y Gabriel Menchaca, quienes con su esfuerzo me han apoyado todos los días de mi vida y a todos los miembros de mi familia que en todo momento me han llevado en sus mentes y en sus corazones.

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente, quiero dar gracias a Dios por darme vida y salud y por haberme permitido cumplir otra meta más en mi vida profesional.

Gracias a mi familia, a mis hijos que me brindan su amor cada día, a mis padres y a mis hermanos Omar, Oscar y Fredy, que siempre han estado al pendiente de mí, dándome su cariño, consejos y apoyo incondicional en todo momento. Sin su esfuerzo y enseñanzas y ejemplos no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

Agradezco a Victorino Rivera por estar siempre a mi lado dándome su comprensión, cariño, su constante motivación, por escucharme, por todos sus consejos y por compartir su optimismo conmigo.

Quiero agradecer especialmente a mi director de tesis, el Dr. Enrique Murillo por haberme dado la oportunidad y permitirme participar en este proyecto de investigación, por confiar en mí para el desarrollo de esta tesis, le doy las gracias por su ayuda incondicional en todo momento que lo requerí y por compartir sus valiosos conocimientos y experiencia conmigo. Sin sus consejos y paciencia esto no hubiera sido posible.

Al licenciado Albano Díaz quien estuvo siempre dándome su apoyo incondicional para que yo pudiese culminar con este proyecto, muchas gracias por su gran amistad y cariño, por su constante motivación, consejos y ánimo para que siguiera adelante.

A la Universidad Tecnológica de Panamá (UTP) y al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT) por su apoyo brindado en el uso del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que sin este gran apoyo no hubiese sido posible culminar con este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
ÍNDICE GENERAL .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
 I. INTRODUCCIÓN .....	 3
 II. ANTECEDENTES.....	 7
2.1. Generalidades de los carotenoides .....	7
2.1.1 Clasificación de los carotenoides .....	8
2.1.2 Propiedades fisicoquímicas de los carotenoides .....	12
2.1.2.1 Color.....	12
2.1.2.2 Solubilidad .....	12
2.1.2.3 Estabilidad.....	13
2.2 Aislamiento y purificación de carotenoides .....	13
2.2.1 Cromatografía en columna.....	14
2.2.2 Fases estacionarias .....	15
2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	16
2.4 Espectroscopía Ultravioleta-Visible .....	17
2.5 Análisis cuantitativo .....	18
2.6 Transporte y distribución de carotenoides a tejidos .....	20
2.7 Funciones biológicas de los carotenoides.....	22
2.7.1 Actividad provitamina A.....	23
2.8 Carotenoides provitamina A .....	24
2.8.1 Conversión de $\beta$ -caroteno a vitamina A.....	28
2.9 Generalidades de la vitamina A.....	30
2.9.1 Fuentes de alimentación.....	31
2.9.2 Funciones de la vitamina A.....	31
2.9.3 Deficiencia de vitamina A.....	33
2.9.4 Digestión de la vitamina A.....	34
2.9.5 Absorción y transporte de la vitamina A .....	34
2.9.6 Vitamina A en tejidos .....	36
2.10 Método biológico para la determinación de actividad provitamina A .....	37
2.10.1 Saponificación y extracción .....	38
2.10.2 Evaporación y dilución .....	39
2.10.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	40
2.11 Determinación bioquímica de retinol en sangre .....	41

III.	JUSTIFICACIÓN .....	43
IV.	OBJETIVOS .....	45
	4.1 Objetivo general .....	45
	4.2 Objetivos específicos .....	45
V.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
	5.1 Aislamiento y purificación de los carotenoides .....	46
	5.1.1 Carotenoides .....	46
	5.1.2 Extracción y saponificación de carotenoides.....	46
	5.1.3 Aislamiento de sapotexantina, criptocapsina y $\beta$ -caroteno .	47
	5.1.4 Determinación del contenido de carotenoides.....	47
	5.2 Alimentación de los animales experimentales .....	49
	5.2.1 Preparación de la mezcla oleosa .....	49
	5.2.2 Preparación de las raciones.....	49
	5.2.3 Alimentación de las ratas.....	51
	5.3 Análisis de plasma y tejidos.....	53
	5.3.1 Obtención de las muestras de plasma y tejidos.....	53
	5.3.2 Determinación de vitamina A en hígado.....	53
	5.3.3 Determinación de vitamina A en plasma.....	54
	5.4 Deposición de carotenoides en los tejidos de las ratas.....	56
	5.4.1 Espectrofotometría UV-Vis de los carotenoides aislados ....	57
	5.5 Análisis estadístico.....	57
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
	6.1 Aislamiento y purificación de los carotenoides .....	58
	6.2 Cambio de peso y consumo de ración.....	58
	6.3 Peso de hígado de los animales experimentales.....	60
	6.4 Separación e identificación de retinol en extractos de hígados.....	60
	6.5 Contenido de vitamina A en hígado.....	63
	6.6 Separación e identificación de retinol en plasma.....	65
	6.7 Contenido de retinol en plasma.....	68
	6.8 Eficacia provitamina A de los carotenoides experimentales.....	69
	6.9 Deposición de carotenoides en tejidos de ratas.....	70
VII.	CONCLUSIONES.....	72
VIII.	RECOMENDACIONES.....	73
VIX	BIBLIOGRAFÍA .....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad Brockmann para la alúmina .....	15
Tabla 2. Coeficientes de absorción ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) de carotenoides comunes .....	19
Tabla 3. Tipos representativos de carotenoides y apocarotenoides con actividad provitamina A .....	25
Tabla 4. Equivalentes de retinol.....	28
Tabla 5. Proporción de reactivos para saponificación .....	39
Tabla 6. Condiciones de los sistemas de cromatografía para vitamina A.....	41
Tabla 7. Composición de las raciones experimentales .....	50
Tabla 8. Composición de la mezcla de vitaminas .....	50
Tabla 9. Composición de la mezcla de minerales .....	51
Tabla 10. Datos para la elaboración de la curva de calibración.....	55
Tabla 11. Cantidad de carotenoides aislados .....	58
Tabla 12. Peso promedio en gramos de las ratas al inicio y final del periodo de alimentación con las raciones experimentales .....	59
Tabla 13. Cantidad de ración y de carotenoides consumidos en 30 días .....	59
Tabla 14. Peso de hígado de ratas en gramos .....	60
Tabla 15. Contenido de vitamina A en hígado en $\mu\text{g/g}$ .....	63
Tabla 16. Concentración de retinol en plasma en $\mu\text{g}/100\text{mL}$ .....	68
Tabla 17. Consumo de alimentos y de carotenoides.....	69
Tabla 18. Eficacia provitamina A de los carotenoides experimentales .....	69
Tabla 19. Contenido de carotenoides en hígado en $\mu\text{g/g}$ .....	71
Tabla 20. Contenido de carotenoides en los tejidos en $\mu\text{g/g}$ .....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los carotenoides $\beta$ - $\kappa$ .....	5
Figura 2. Estructuras de all-trans-licopeno y all-trans-criptoxantina.....	7
Figura 3. Ejemplo de carotenos.....	10
Figura 4. Ejemplo de xantófilas.....	11
Figura 5. Funciones o acciones que promueven la salud atribuidas a los carotenoides.....	23
Figura 6. Estructuras de los carotenoides con actividad provitamina A, excepción de la luteína.....	26
Figura 7. Las principales vías oxidativas en el metabolismo del $\beta$ -caroteno. ....	29
Figura 8. Una visión general de la digestión y absorción de la vitamina A.....	35
Figura 9. Frutas utilizadas para la obtención de los carotenoides de interés.....	48
Figura 10. Separaciones por cromatografía de columna abierta empacada con $\text{Al}_2\text{O}_3$ .....	48
Figura 11. Jaulas utilizadas en la distribución de las ratas para su alimentación con las raciones experimentales.....	52
Figura 12. Las diferentes raciones de alimentos suministrados a las ratas.....	52
Figura 13. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del patrón de retinol .....	61
Figura 14. Cromatograma HPLC de una muestra control .....	61
Figura 15. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del pico principal del grupo $\beta$ -caroteno.....	62
Figura 16. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del pico principal del grupo sapotexantina.....	62
Figura 17. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del pico principal del grupo criptocapsina.....	63
Figura 18. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de retinol y acetato de retinol (estándar).....	65
Figura 19. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo control (plasma).....	66
Figura 20. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo $\beta$ -caroteno (plasma) .....	66
Figura 21. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo sapotexantina (plasma) .....	67
Figura 22: Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo criptocapsina (plasma) .....	67

## **ABREVIATURAS**

ANOVA: Análisis de varianza

BCO1:  $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno 15,15'-oxigenasa

BCO2:  $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno 9',10'-oxigenasa

BHT: Butilhidroxitolueno

CRBP2: Proteína de unión al retinol celular tipo 2

DAD: Detector de arreglo de diodos

EDTA: Ácido etilendiamintetraacético

ER: Equivalentes de retinol

FN: Fase normal

FR: Fase reversa

CGL: Cromatografía de gas líquido

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LRAT: Lecitina retinol aciltransferasa

PLT: Triacilglicerol lipasa pancreática

RBP: Proteína de unión al retinol

RT: Proteína de transporte de retinol

TLC: Cromatografía de capa delgada

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

## RESUMEN

### ACTIVIDAD PROVITAMINA A DE CAROTENOIDES $\beta$ - $\kappa$ Y DEPOSICIÓN EN TEJIDOS DE RATAS

La vitamina A es esencial para mantener la salud y la supervivencia. La deficiencia de esta vitamina es un problema nutricional importante en los países en desarrollo. Se estima que 75 a 140 millones de niños son deficientes en esta vitamina. En la dieta, la vitamina A se puede encontrar como retinol (vitamina preformada) o como carotenoides provitamina A. Es conocido que sólo los carotenoides que contienen un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido, en su estructura química, se convierten en vitamina A. Esta generalización se basa en estudios con carotenoides  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ - $\epsilon$  y  $\beta$ - $\gamma$ , y  $\beta$ -apocarotenoides. Recientemente, se ha encontrado que el mamey (*Pouteria sapota*) (una fruta nativa de América Central), contiene altas concentraciones de sapotexantina y criptocapsina, carotenoides  $\beta$ - $\kappa$  (con anillos  $\beta$ -ionona no sustituidos), y por lo tanto con potencial de actividad provitamina A. Considerando que la transformación de los carotenoides en vitamina A es catalizada por enzimas, es necesario demostrar que los carotenoides  $\beta$ - $\kappa$  pueden ser transformados en vitamina A por las enzimas del intestino de mamíferos. Hasta el momento, no existe información de estudios sobre evaluación de actividad provitamina A en carotenoides con anillo  $\beta$ - $\kappa$ , en animales. En este estudio se evaluó la capacidad de los carotenoides, que poseen anillos  $\beta$ - $\kappa$ , para transformarse en Vitamina A, en ratas machos recién destetados. Se determinó el contenido de vitamina A en hígados y plasma de ratas, alimentadas por 30 días con dietas que contenían sapotexantina y criptocapsina (carotenoides  $\beta$ ,  $\kappa$ ). Paralelamente un grupo de ratas se alimentaron con  $\beta$ -caroteno (control positivo) y otro grupo con una dieta libre de vitamina A (control negativo). Además, se determinó la deposición de los carotenoides en diferentes tejidos (hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón y músculo), como indicador del grado de absorción. El contenido de carotenoides y vitamina A, se determinó por HPLC con detector de arreglo de diodo. Los resultados demostraron que los carotenoides con anillo  $\beta$ - $\kappa$  (sapotexantina y criptocapsina) poseen actividad provitamina A “*in vivo*” ya que en el hígado y en el plasma ratas alimentadas con raciones que contenían estos carotenoides, se observó un aumento significativo de la vitamina A, en comparación con el control (sin carotenoide). Esta es la primera evidencia experimental sobre la actividad provitamina A, “*in vivo*” de carotenoides  $\beta$ - $\kappa$ . Con relación a la deposición de los carotenoides experimentales en los tejidos, se demostró que la sapotexantina se acumula principalmente en hígado y riñón, mientras la criptocapsina en el bazo. La concentración de sapotexantina en el hígado fue mayor que la de criptocapsina, a pesar que el grupo criptocapsina ingirió más carotenoide.

## SUMMARY

### ACTIVITY PROVITAMIN A OF CAROTENOIDS $\beta$ - $\kappa$ AND DEPOSITION IN TISSUE OF RATS

Vitamin A is essential to maintain health and survival. Deficiency of this vitamin is an important nutritional problem in developing countries. It is estimated that 75 to 140 million children are deficient in this vitamin. In the diet, vitamin A can be found as retinol (preformed vitamin) or as provitamin A carotenoids. It is known that only carotenoids that contain an unsubstituted  $\beta$ -ionone ring, in their chemical structure, become vitamin A. This generalization is based on studies with  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ - $\epsilon$  and  $\beta$ - $\gamma$  carotenoids, and  $\beta$ -apocarotenoids. Recently, mamey (*Pouteria sapota*) (a fruit native to Central America) has been found to contain high concentrations of sapotexanthin and cryptocapsin,  $\beta$ - $\kappa$  carotenoids (with unsubstituted  $\beta$ -ionone rings), and therefore with potential for Provitamin A activity. Whereas the transformation of carotenoids into vitamin A is catalyzed by enzymes, it is necessary to demonstrate that  $\beta$ - $\kappa$  carotenoids can be transformed into vitamin A by enzymes in the mammalian intestine. So far, there is no information from studies on the evaluation of provitamin A activity in carotenoids with  $\beta$ - $\kappa$  ring in animals. In this study, the ability of carotenoids, which have  $\beta$ - $\kappa$  rings, to transform into Vitamin A, in newly weaned male rats was evaluated. Vitamin A content in rats livers and plasma was determined, fed for 30 days with diets containing sapotexanthin and cryptocapsin ( $\beta$ ,  $\kappa$  carotenoids). In parallel, one group of rats were fed with  $\beta$ -carotene (positive control) and another group with a vitamin A free diet (negative control). In addition, the deposition of carotenoids in different tissues (liver, kidney, spleen, lung, heart and muscle) was determined as an indicator of the degree of absorption. The content of carotenoids and vitamin A was determined by HPLC with diode array detector. The results showed that  $\beta$ - $\kappa$  ring carotenoids (sapotexanthin and cryptocapsin) possess provitamin A activity *in vivo* since rats fed rations containing these carotenoids in the liver and plasma, a significant increase in vitamin A was observed, compared to the control (without carotenoid). This is the first experimental evidence on the provitamin A, "*in vivo*" activity of  $\beta$ - $\kappa$  carotenoids. In relation to the deposition of experimental carotenoids in tissues, it was shown that sapotexanthin accumulates mainly in the liver and kidney, while cryptocapsin in the spleen. The concentration of sapotexanthin in the liver was higher than that of cryptocapsin, although the cryptocapsin group ingested more carotenoid.

## I. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos que se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas, raíces, flores, pescados, invertebrados y pájaros. Los carotenoides ocurren invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores, aunque en este tejido fotosintético su color está enmascarado por el de la clorofila. También se encuentran en las algas, bacterias, hongos y levaduras. Se ha caracterizado estructuralmente más de 750 carotenoides y esta es una lista que crece continuamente a medida que nuevos compuestos son descubiertos (Namitha y Negi, 2010).

En los últimos años ha incrementado el interés por los carotenoides de la dieta debido a su actividad provitamina A (Olson y Hayaishi, 1965; Nagao *et al.*, 1997), el elevado potencial antioxidante, aumento de inmunidad, inhibición del cáncer, prevención de enfermedades cardiovasculares, prevención de la degeneración macular y disminución del riesgo de formación de cataratas (Deming *et al.*, 2002).

La actividad provitamina A de los carotenoides se refiere a la capacidad que tienen algunos para convertirse en retinol. La estructura química necesaria para dicha actividad implica la presencia de un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido unido a un polieno de 7-15 carbonos intacto (Olson, 1989).

Teóricamente, en base a su estructura química, al  $\beta$ -caroteno se le asigna una actividad provitamínica de 100%. En humanos se ha estimado que los carotenoides provitamina A contribuyen con el 40 - 80% de la vitamina A. La conversión del  $\beta$ -caroteno a vitamina A en los humanos y en el tejido animal es catalizada por la enzima  $\beta$ -caroteno-15,15'-oxigenasa (BCO1) (Bachmann *et al.*, 2002; Olson y Hayaishi, 1965).

La tasa de deposición de carotenoides en órganos y tejidos depende de la absorción selectiva a través de la pared intestinal, por una parte, y de su utilización y excreción por otra. Los diferentes grupos de animales seleccionan diferentes tipos de carotenoides. Los mamíferos, por ejemplo, tienen preferencia por la absorción del  $\beta$ -caroteno, mientras que los peces y las aves absorben las xantófilas mucho mejor (Schiedt *et al.*, 1985).

La eficacia de absorción (en relación con su entrada en plasma) de los carotenoides a partir de fuentes dietéticas y en ausencia de parásitos intestinales, enfermedades o desórdenes metabólicos digestivos está probablemente influida por: a) la eficacia de la liberación (extracción) a partir de la matriz-alimento, b) presencia de suficiente contenido lipídico (triglicéridos) para solubilizar el carotenoide liberado y estimular la síntesis de quilomicrones, c) presencia de factores que interfieran en el lumen intestinal (fibra vegetal, hierro, otros antioxidantes, etc.) y d) proporción de conversión de carotenoides provitamínicos A en retinol en la mucosa (Parker *et al.*, 1997; Castenmiller *et al.*, 1998).

Los carotenoides disueltos en aceite son más absorbibles que los incorporados en la matriz alimentaria tal como se presentan en frutas y hortalizas. Uno de los factores que más afecta la biodisponibilidad de los carotenoides es su liberación de la matriz física (alimento) en la cual son ingeridos y su disolución en la fase lipídica (Parker, 1996).

La eficacia de absorción de los carotenoides varía entre 5-80% y disminuye al aumentar la cantidad ingerida (Erdman *et al.*, 1993; Van Vliet *et al.*, 1996). La diferencia entre los estudios se relaciona con el tipo o modelo utilizado, estructura química y polaridad del carotenoide ya que, en muchos casos, no se tiene en cuenta la conversión en retinol (Kostic *et al.*, 1995; Van Vliet *et al.*, 1996; De Pee *et al.*, 1996).

En nuestro país existe una gran diversidad de frutas y vegetales ricos en carotenoides, pero muchas frutas aún no han sido estudiadas y en ellas podemos encontrar carotenoides no estudiados hasta el momento. La sapotexantina ( $\beta$ ,  $\kappa$ -caroten-6'-ona) y la criptocapsina ((3'S,5'R)-3'-Hidroxi- $\beta$ ,  $\kappa$ -caroten-6'-ona) (Figura. 1), carotenoides que se han encontrado en altas concentraciones en el mamey (*Pouteria sapota*), poseen un anillo  $\beta$ - $\kappa$  terminal y un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido, lo cual en principio le confiere actividad provitamina A. La sapotexantina es un carotenoide descubierto recientemente en el mamey por el grupo de investigación de (Murillo *et al.*, 2010; Murillo *et al.*, 2011).

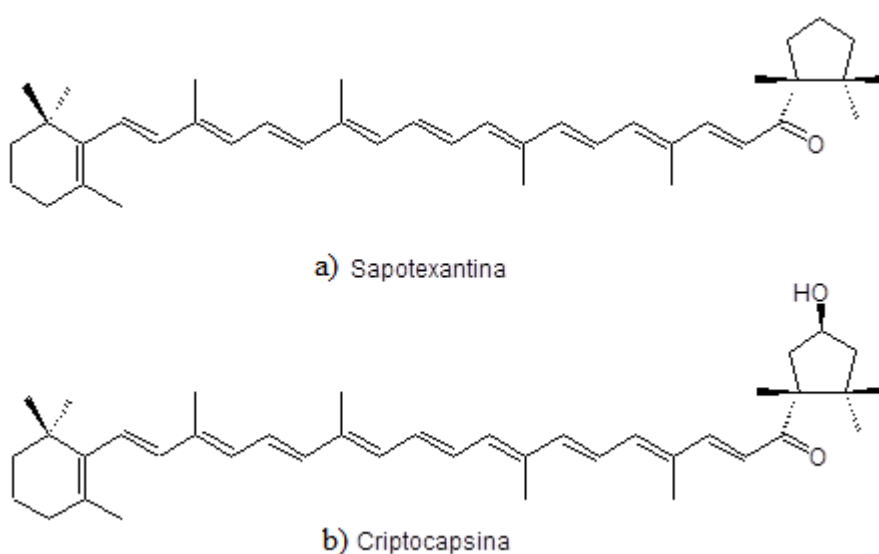


Figura 1. Estructura de los carotenoides  $\beta$ - $\kappa$ : a) Sapotexantina y b) Criptocapsina.

La criptocapsina es un carotenoide que se ha encontrado en otras especies como la paprika (*Capsicum annuum*) en cantidades trazas (Collera-Zúñiga *et al.*, 2005). La alta

concentración de este carotenoide en el mamey (*Pouteria sapota*) nos ha llevado a seleccionarlo como la fuente para su obtención (Murillo *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se pretende determina la actividad provitamina A de los carotenoides con anillo  $\beta$ - $\kappa$  del mamey y su selectividad por algunos tejidos de ratas.



## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de los Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles que se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y están conformados por moléculas orgánicas (Ötles y Çagind, 2007). Generalmente los carotenoides correspondientes a los alimentos son los C40 terpenoides con 8 unidades de isopreno, con uniones de cola y cabeza en la parte exterior y cola-cola en la parte interna. (Figura. 2). En el centro de estos compuestos se encuentran un gran número de enlaces dobles que constituyen el cromóforo, el cual les da la capacidad de absorber la luz y determinar la estructura molecular y actividad química (Ötles y Çagind, 2007; Namitha y Negi, 2010). Todos los carotenoides son derivados del licopeno, el primero que se biosintetiza; a partir de éste y por reacciones de ciclación se obtienen los demás pigmentos (Ötles y Çagind, 2007; Takaichi *et al.*, 2012).

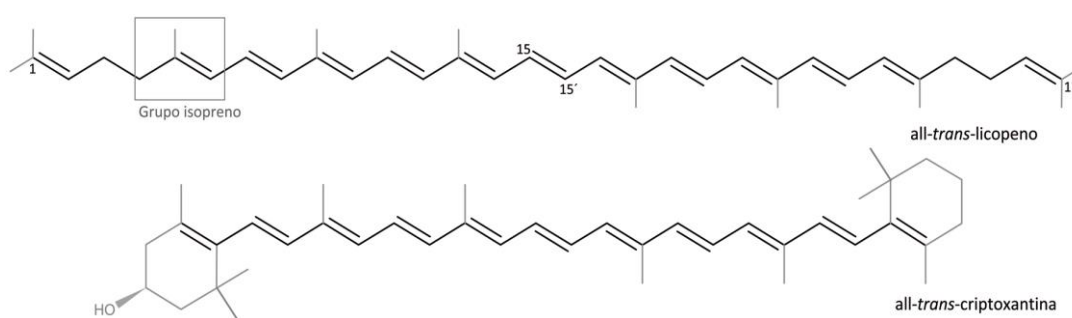


Figura 2. Estructuras de *all-trans*-licopeno y *all-trans*-criptoxantina. La estructura enmarcada corresponde al grupo isopreno y la estructura marcada en negro al cromóforo en cada una de las moléculas.

En general, los carotenoides no se encuentran distribuidos ampliamente en los animales, ya que estos no son capaces de biosintetizarlos; sin embargo, estos pigmentos son fundamentales en su alimentación, pues son fuente de vitamina A. Existen algunas excepciones, como es el caso de la trucha y algunos crustáceos que atribuyen su color rojizo a la presencia de astaxantina. Los carotenoides son los responsables de los colores amarillos, anaranjados y rojos que presentan los alimentos, los tallos, flores y hojas de plantas, bacterias y algunos animales invertebrados marinos. En los tejidos verdes se localizan en los cloroplastos, y en los tejidos rojos, anaranjados y amarillos se encuentran en los cromoplastos (Eldahshan y Nasser, 2013).

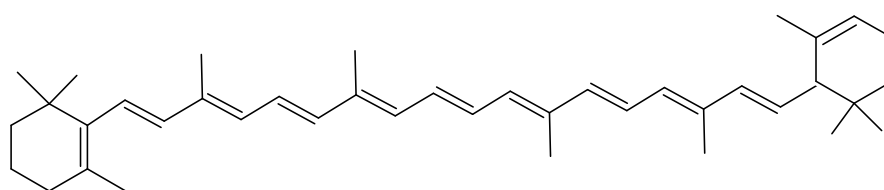
Varios estudios epidemiológicos han mostrado una relación entre el alto consumo de frutas y vegetales, y una disminución en el riesgo de contraer enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular, debido principalmente a la presencia de compuestos con actividad antioxidante. Los pigmentos naturales, como los carotenoides y antocianinas, se caracterizan por sus excelentes propiedades antioxidantes, contribuyendo así con esta función. (Eldahshan y Nasser, 2013).

### **2.1.1. Clasificación de los carotenoides**

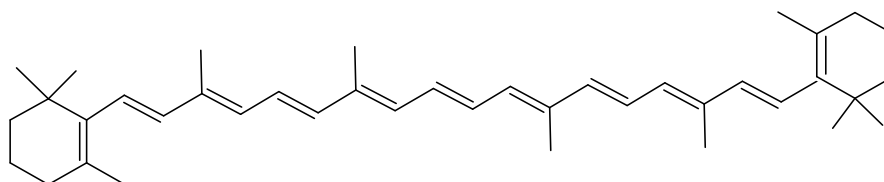
De acuerdo con la estructura de los carotenoides se pueden dividir en carotenos y xantófilas. Los carotenos son hidrocarburos poliénicos, entre estos se encuentran el  $\alpha$ ,  $\beta$ -caroteno y el licopeno (Figura. 3). Cambios en las ciclaciones pueden originar diferentes colores como por ejemplo el  $\alpha$  y  $\beta$ - caroteno que son rojo-anaranjado y anaranjado, respectivamente (Matthews y Wurtzel, 2007; Ötles y Çagınd, 2007).

Por otra parte, las xantófilas son derivados oxigenados de los carotenos (Figura. 4); los grupos sustitutos principales son hidroxilo, metoxilo, carbonilo, ceto o epóxidos (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Ejemplos de éstos los constituyen la criptoxantina, violaxantina y cantaxantina (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

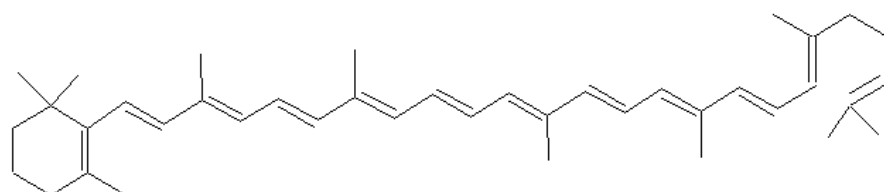
Debido a la larga cadena de enlaces dobles que tienen los carotenoides en general, se presentan una serie de isómeros para cada uno de estos pigmentos; la longitud de las moléculas va a estar determinada por la configuración de estos dobles enlaces. De ahí que se van a tener en ocasiones también sus formas *cis* o *trans* (Cazzonelli y Pogson, 2010).



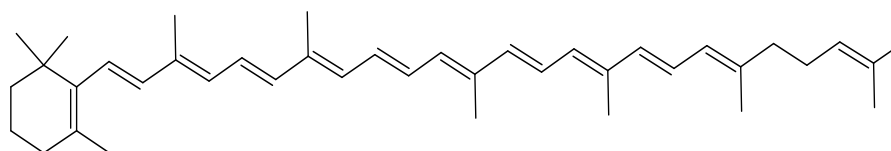
a)  $\alpha$ -caroteno



b)  $\beta$ -caroteno

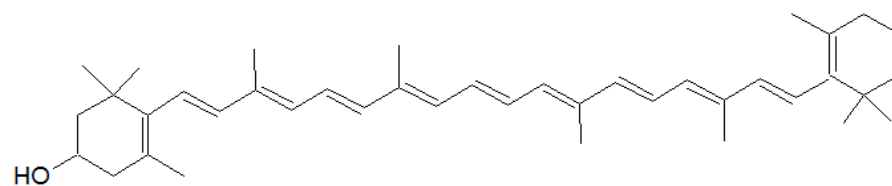


c)  $\gamma$ -caroteno

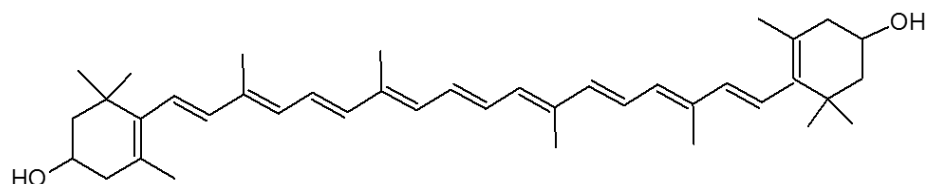


d)  $\delta$ -caroteno

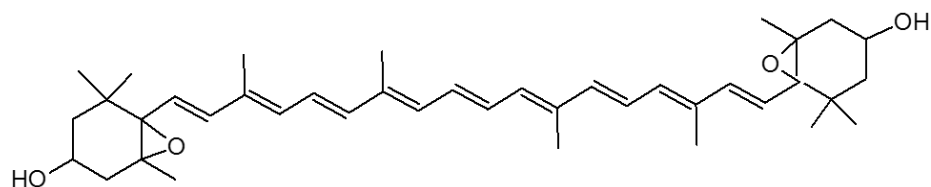
Figura 3. Ejemplos de carotenos: a)  $\alpha$ -caroteno, b)  $\beta$ -caroteno, c)  $\gamma$ -caroteno y d)  $\delta$ -caroteno.



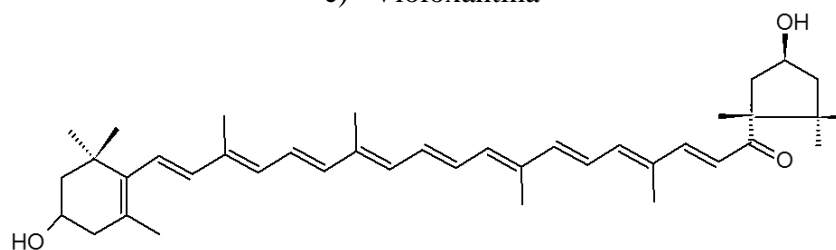
a)  $\beta$ -criptoxantina



b) Zeaxantina



c) Violoxantina



d) Capsantina

Figura 4. Ejemplos de xantófilas: a)  $\beta$ -criptoxantina, b) Zeaxantina, c) Violoxantina, d) Capsantina.

## **2.1.2. Propiedades fisicoquímicas de los carotenoides.**

### **2.1.2.1. Color:**

La característica estructural responsable del color observado de los carotenoides es su cadena de dobles enlaces conjugados. El color que se puede ver en solución y durante cromatografía, facilita grandemente la separación y hace más fácil el monitoreo de los pasos de purificación y reacciones químicas de los carotenoides. La pérdida o cambios de color durante el análisis de carotenoides dan una señal inmediata de descomposición o modificación estructural. La intensiva absorción de luz provee una base para la determinación cuantitativa de carotenoides. (Rodríguez-Amaya y Amaya-Farfán, 2006).

### **2.1.2.2. Solubilidad:**

Los carotenoides son sustancias lipofílicas; insolubles en agua, solubles en solventes orgánicos; tales como acetona, alcohol, éter etílico, cloroformo y acetato de etilo.

Los carotenos son fácilmente solubles en éter de petróleo, hexano, y tolueno; las xantófilas se disuelven mejor en metanol y etanol. Los carotenoides cristalinos son difíciles de disolver en estos solventes; pero se disuelven bien en benceno y diclorometano. (Rodríguez-Amaya y Amaya-Farfán, 2006).

### **2.1.2.3. Estabilidad:**

Los carotenoides tienen una baja estabilidad debido a su cadena poliénica. Son inestables en presencia de luz y oxígeno. Estos compuestos aislados, secos o en solución son susceptibles a la isomerización (E/Z) y oxidación o peroxidación causadas por el calor, la luz y productos químicos. Esto resulta en alguna pérdida de color y de la actividad de provitamina A. La degradación de los carotenoides se debe fundamentalmente a reacciones de oxidación, no enzimáticas o enzimáticas, debidas a las lipooxigenasas. (Rodríguez-Amaya y Amaya-Farfán, 2006).

## **2.2. Aislamiento y purificación de carotenoides**

Los carotenoides pertenecen al grupo de pigmentos naturales liposolubles, los cuales se caracterizan por presentar una larga cadena carbonada, de 40 átomos de carbono, que contiene dobles enlaces conjugados a los cuales se les atribuye su color y su susceptibilidad a degradaciones por exposición a la luz y a altas temperaturas, por lo tanto su extracción debe realizarse rápidamente a temperatura ambiente o por debajo de esta, en un lugar donde no se expongan a la luz directamente, empleando solventes no polares como éter etílico, éter de petróleo o hexano, entre otros (L. Jeyanthi *et al.*, 2014).

Una vez obtenido el extracto es necesario usar antioxidantes (por ejemplo, butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico o pirogalol, entre otros) para evitar su oxidación y poder preservar los carotenoides libres (L. Jeyanthi R. *et al.*, 2014).

El método tradicional usado para la separación de carotenoides es la cromatografía en columna. Esta técnica se usa para aislar y purificar estos pigmentos, donde la

separación es seguida visualmente; sin embargo, este método presenta la desventaja que las condiciones de la columna, como exposición a la luz y al aire no son controladas lo cual genera poca reproducibilidad. Otro de los métodos convencionales de separación y análisis de estos tetraterpenoides es la cromatografía en capa delgada, sin embargo, presenta la desventaja que durante este proceso los carotenoides son susceptibles de sufrir oxidaciones, degradaciones e isomerizaciones debido a la sílice y a la presencia de oxígeno. Estas dos técnicas requieren grandes cantidades de muestra, por lo tanto, es conveniente emplear otras técnicas que sean más rápidas, que permitan controlar las condiciones de separación para disminuir la degradación de estos compuestos, y que requieran menores cantidades de extracto para el análisis. (Oliver y Palou, 2000).

Para grandes escalas la separación y purificación es más práctica llevándose a cabo en cromatografía de columna abierta y para escalas muy pequeñas de trabajo el uso de TLC o HPLC.

### **2.2.1. Cromatografía en columna**

La cromatografía en columna es un método indispensable para la separación y purificación de carotenoides en escala preparativa. En una cromatografía en columna, el sólido o fase estacionaria es empacada en un tubo o columna, en donde una mezcla de compuestos en solución es separada pasando el solvente o fase móvil a través de la columna. En el campo de los carotenoides la fase móvil se elige para separar los compuestos principales debido a sus fuerzas de adsorción (Rodríguez-Amaya, 2001)

La ventaja de la cromatografía en columna en el campo de los carotenoides es su simple y económico equipo, un tubo de vidrio que permite la migración de estos componentes, los cuales son monitoreados visualmente.



### 2.2.2. Fases estacionarias

La elección de los adsorbentes para cromatografía de carotenoides es extensiva; entre ellos podemos mencionar: la celulosa,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{ZnCO}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , sílica gel, kieselguhr, microcelita y varias mezclas de estos adsorbentes, pueden ser usados. (Rodríguez-Amaya, 2001). La alúmina y la sílica; son los adsorbentes más utilizados en una variedad de diferentes calidades. Estos son usados para la separación general de mezclas de carotenos y xantofilas y para la purificación de carotenoides sintetizados.

Las separaciones de estos adsorbentes son determinadas por la polaridad. Los carotenos hidrocarbonados son débilmente adsorbidos; mientras que las xantófilas, que contienen sustituyentes polares, especialmente grupos hidroxilo, son más fuertemente adsorbidos. La alúmina libre de agua es muy reactiva y puede descomponer las xantófilas.

La tabla 1, muestra la actividad Brockmann para la alúmina. (Rodríguez-Amaya, 2001; Oliver y Palou, 2000).

Tabla 1. Actividad Brockmann para la alúmina.

Actividad	I	II	III	IV	V
Contenido de $\text{H}_2\text{O}$ (%)	0	3	6	10	15

La actividad II o III; las cuales son frecuentemente usada, son obtenidas por la adición de 3% o 6% de  $\text{H}_2\text{O}$  a la alúmina.

### **2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Este método es muy eficiente, da una excelente separación en un corto tiempo, es altamente sensitivo y da una gran información, especialmente si los equipos cromatográficos incluyen un detector de arreglo de fotodiodo, siendo una ventaja debido a que los espectros de absorción pueden ser adquiridos a diferentes longitudes de onda y una computadora que ayuda a procesar los datos. La alta sensibilidad del HPLC permite la detección de pequeñas cantidades de carotenoides y de isómeros geométricos. (Días *et al.*, 2010).

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa es muy utilizada, en donde los componentes eluyen por partición y tienen un orden inverso al observado en una cromatografía en columna abierta de fase normal; es decir los carotenoides más polares eluyen primero y los menos polares eluyen de último (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004; Taylor, L.K, 2006).

La fase estacionaria más utilizada para la separación de los carotenoides era la C18, pero Sander *et al.*, 2000, demostraron que esta columna no permitía separar adecuadamente una mezcla compleja de estos pigmentos. Por esta razón consideraron necesario aumentar la cadena hidrocarbonada de 18 a 30 átomos de carbono para permitir una mayor interacción de dicha fase estacionaria con los analitos y desarrollaron las columnas C30, catalogadas como específicas para el análisis de carotenoides (Rodríguez-Amaya y Kimura., 2004).

## 2.4. Espectroscopia Ultravioleta-Visible

El sistema de doble enlaces conjugados es responsable de que los carotenoides presenten fuertes bandas de absorción en la región visible, o en algunos casos, región ultravioleta del espectro. Los carotenoides en solución obedecen la ley de Lambert-Beer; su absorción es directamente proporcional a la concentración, por lo que un análisis cuantitativo y exacto puede lograrse utilizando métodos espectrofotométricos. El espectro ultravioleta es el primer diagnóstico para la identificación de carotenoides. La longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) y la forma del espectro (estructura fina del espectro) son propiedades características de los cromóforos (Britton G, 1995)

Muchos carotenoides presentan máxima absorción en tres longitudes de ondas diferentes, resultando en tres picos en el espectro. El espectro de absorción de los carotenoides depende marcadamente de los solventes empleados para realizar la lectura (Britton G., 1995).

La  $\lambda_{\text{máx}}$ , es principalmente una función de la longitud de los dobles enlaces conjugados del compuesto, y esta longitud de onda incrementa cuando el número de dobles enlaces conjugados incrementa. Con un cromóforo largo es más fácil promover los electrones  $\pi$  de enlace al estado excitado, por lo que la energía requerida para la transición se reduce y la absorción ocurre a mayores longitudes de onda. Así, el licopeno (con 11 dobles enlaces conjugados) es rojo y absorbe a longitudes de onda más largas (444, 470 y 502 nm), mientras que el  $\zeta$ -caroteno es ligeramente amarillo y absorbe a longitudes de ondas más cortas (378, 400 y 425 nm) (Britton, 1995; Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004)

El espectro de las xantófilas es usualmente determinado en etanol, los del caroteno en éter de petróleo o hexano. Las  $\lambda_{\text{máx}}$  dependen marcadamente del solvente en el cual es determinado el espectro. (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

Otros solventes como acetona, benceno, cloroformo o diclorometano también pueden ser usados.

## **2.5. Análisis cuantitativo**

El análisis cuantitativo de una mezcla de carotenoides implica la separación adecuada de sus componentes, preferiblemente mediante cromatografía HPLC, y la identificación de los mismos por interpretación de sus espectros de absorción. La cuantificación se hace fácil cuando se obtienen cromatogramas con buena resolución, que es cuando se logra una buena separación en la línea base. De acuerdo con la ley de Lambert-Beer la linealidad de respuesta suele ser bastante buena y el área o la altura del pico son proporcionales a la cantidad del componente (Britton G, 1995).

El coeficiente de absorción de un carotenoide ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) es la absorbancia a una determinada longitud de onda dada, de una solución a 1% medida en una celda de 1cm. En la tabla 2, se presentan los coeficientes de absorción de algunos carotenoides. Para la cuantificación de carotenoides deben usarse patrones con un alto grado de pureza, con los valores del coeficiente de absorción y la absorbancia del patrón puede obtenerse su concentración. El cromatograma del patrón posee un factor de respuesta, definido como la relación entre la concentración de carotenoide y la altura o área del pico correspondiente. Para obtener una concentración desconocida se multiplica el área o altura del pico del carotenoide por el factor de respuesta de su respectivo patrón. Otra forma de calcular una concentración desconocida es interpolando en una curva de

calibración de patrones (área o altura del pico versus concentración o cantidad) (Britton G., 1995; Rodríguez-Amaya. D., 2001).

Tabla 2. Coeficientes de absorción ( $A^{1\%}_{1cm}$ ) de carotenoides comunes.

<b>Carotenoides</b>	<b>Disolvente</b>	<b><math>\lambda_{m\acute{a}x}</math>, nm</b>	<b>(<math>A^{1\%}_{1cm}</math>)</b>
<b>Capsantina</b>	Benceno	483	2072
<b>Capsorubina</b>	Benceno	489	2200
<b><math>\alpha</math>-Caroteno</b>	Éter de petróleo	444	2800
	Hexano	445	2710
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>	Éter de petróleo	450	2592
	Etanol	450	2620
<b><math>\delta</math>-Caroteno</b>	Éter de petróleo	456	3290
<b><math>\gamma</math>-Caroteno</b>	Éter de petróleo	462	3100
	Hexano	462	2760
<b><math>\zeta</math>-Caroteno</b>	Hexano	400	2555
<b><math>\alpha</math>-Criptoxantina</b>	Hexano	445	2636
<b><math>\beta</math>-Criptoxantina</b>	Éter de petróleo	449	2386
	Hexano	450	2460
<b>Luteína</b>	Etanol	445	2550
	Éter dietílico	445	2480
<b>Licopeno</b>	Éter de petróleo	470	3450
<b>Fitoeno</b>	Éter de petróleo	286	1250
<b>Violaxantina</b>	Etanol	440	2550
	Acetona	442	2400

## 2.6. Transporte y distribución de carotenoides a tejidos

Los carotenoides se liberan en el bolo alimenticio por medio de gotas lipídicas en el estómago o intestino, dándose luego la formación de vesículas multilaminares o micelas debido a la acción de sales biliares y lipasas pancreáticas. Estas micelas se difunden por la mucosa duodenal a través de la membrana del enterocito, por mecanismos que involucran difusión pasiva, similar al colesterol y a los productos de la lipólisis de triglicéridos (Parker, 1996; Mínguez, MT *et al.*, 2006).

Los quilomicrones son los responsables del transporte de los carotenoides desde la mucosa intestinal hacia el torrente sanguíneo vía sistema linfático. A continuación, los carotenoides se acumulan en el tejido adiposo e hígado, aunque se ha descrito su presencia en el pulmón, riñón, piel y médula espinal. El plasma, al ser el medio de distribución de estos pigmentos, mantiene siempre una reserva de carotenoides circulando, transportados en lipoproteínas LDL o de baja densidad en el caso de los  $\beta$ -carotenos, y en lipoproteínas tanto de alta densidad (HDL) como de baja densidad (LDL) en el caso de las xantófilas (Parker, 1996; Mínguez *et al.*, 2006).

La tasa de deposición de carotenoides en órganos y tejidos depende de la absorción selectiva a través de la pared intestinal, por una parte, y de su utilización y excreción por otra. Los diferentes grupos de animales seleccionan diferentes tipos de carotenoides. Los mamíferos, por ejemplo, tienen preferencia por la absorción del  $\beta$ -caroteno, mientras que los peces y las aves absorben las xantofilas mucho mejor (Schiedt *et al.*, 1985; Rao y Rao, 2007).

Durante la madurez sexual los carotenoides pueden ser movilizados hacia los órganos reproductivos y huevos, favoreciendo la fertilidad y reproducción (Schiedt K *et al.*, 1985)

En plasma, los carotenos se encuentran fundamentalmente unidos a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) mientras que las xantofilas se encuentran más uniformemente distribuidas entre lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). Presumiblemente, los carotenoides apolares (licopeno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno) se sitúan en el núcleo hidrofóbico mientras que los polares (xantofilas) se sitúan en la superficie de las lipoproteínas (Parker, 1996). Esta orientación puede influir en la transferencia de carotenoides entre lipoproteínas, aunque ésta parece escasa y muy lenta. El  $\beta$ -caroteno no se transfiere de forma rápida entre lipoproteínas mientras que las xantofilas probablemente sufran una transferencia más rápida, resultando en un equilibrio entre lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL). El intercambio entre lipoproteínas influye sobre las concentraciones en diferentes clases de lipoproteínas frente al tiempo, hecho utilizado para evaluar la biodisponibilidad de carotenoides. (Rao y Rao, 2007; McGraw y Toomey, 2010).

Aunque el  $\beta$ -caroteno y el licopeno son los carotenoides predominantes en suero de diversas poblaciones, las concentraciones y los porcentajes relativos de carotenoides para un mismo órgano varían considerablemente entre individuos. En términos relativos, se detectan niveles altos de  $\beta$ -caroteno y licopeno en hígado, glándulas adrenales y testículos, con concentraciones menores en pulmón y riñón. (McGraw y Toomey, 2010).

A pesar de que los carotenoides hidrocarbonados son muy lipofílicos, sus niveles en tejido adiposo son relativamente bajos en comparación con otros tejidos como hígado y testículo. Sin embargo, dado que el tejido adiposo representa el 20% del peso corporal total, su contribución al contenido total de carotenoides es considerable, constituyendo, junto con el hígado, los principales depósitos en el organismo. Por otro lado, parece

existir una distribución preferente de carotenoides según los tejidos. Así, mientras que en testículo el carotenoide principal es el licopeno, en la retina y cristalino, luteína y zeaxantina constituyen prácticamente los únicos carotenoides presentes (McGraw y Toomey, 2010).

## **2.7. Funciones biológicas de los carotenoides**

Las funciones de los carotenoides en tejidos biológicos es en gran parte consecuencia de sus propiedades de absorción de luz.

Los carotenoides desempeñan un papel importante en la nutrición humana debido a su actividad de provitamina A. Los carotenoides también se han relacionado con un aumento del sistema inmune y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada a la edad y formación de cataratas (Eldahshan y Nasser, 2013) (Figura. 5). Estos efectos biológicos son independientes de la actividad de provitamina A y se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres (átomos o grupos de átomos que poseen un electrón no compartido) y la captura del oxígeno singlete (Rodríguez-Amaya *et al.*, 2006). La capacidad de los carotenoides para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema de enlace doble conjugado y los que tienen nueve o más enlaces dobles otorgan la máxima protección (Fiedor y Burda, 2014). Se observó que el licopeno acíclico era más efectivo que el  $\beta$ -caroteno bicíclico. Los resultados obtenidos con un sistema iniciado de radicales libres también sugirieron que la cantaxantina y astaxantina, ambas con grupos ceto conjugados eran mejores antioxidantes que el  $\beta$ -caroteno y zeaxantina (Fiedor y Burda. K, 2014).



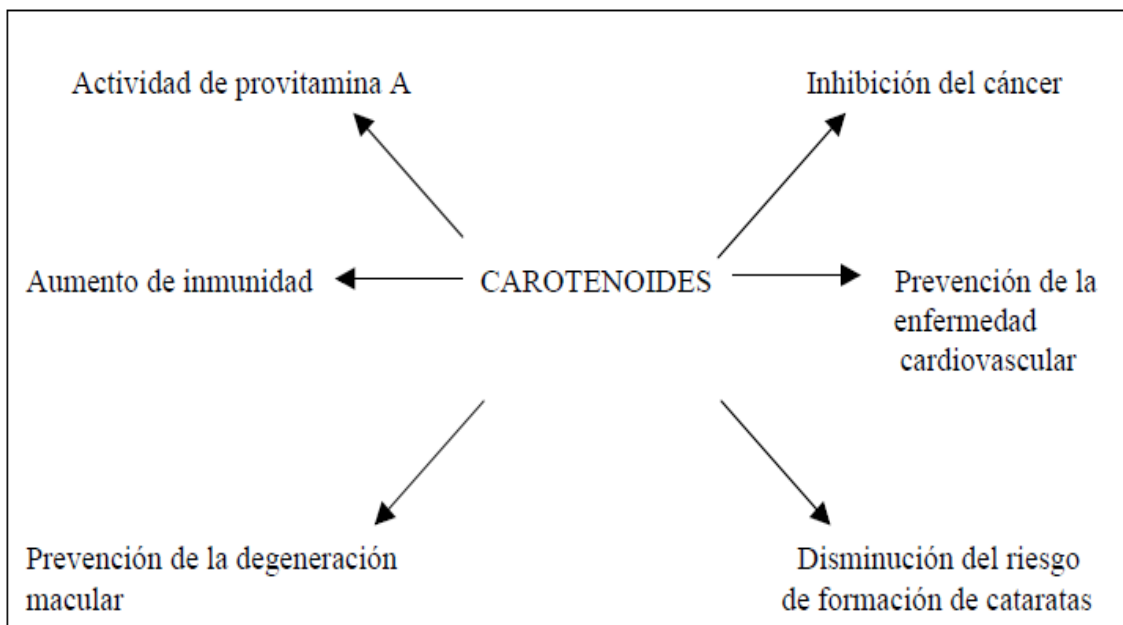


Figura 5. Funciones o acciones que promueven la salud atribuidas a los carotenoides.

### 2.7.1 Actividad provitamina A

La importancia de los carotenoides en los alimentos va más allá de su rol como pigmentos naturales. En forma creciente se han atribuido a estos compuestos funciones y acciones biológicas. De hecho, por mucho tiempo se ha sabido de la actividad de provitamina A de los carotenoides. La dieta proporciona la vitamina A en forma de vitamina A preformada (retinil éster, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinoico) a partir de alimentos de origen animal como por ejemplo hígado, leche y productos lácteos, pescado y carne, o como carotenoides que se pueden transformar biológicamente a vitamina A (provitaminas A) generalmente a partir de alimentos de origen vegetal. Sobre una base mundial, se estima que aproximadamente el 60% de la vitamina A dietaria proviene de las provitaminas A (Fiedor y Burda, 2014). Debido al costo generalmente prohibitivo de los alimentos animales, la contribución dietaria de la

provitamina A aumenta a un 82% en los países en desarrollo. También, la provitamina A tiene la ventaja de convertirse a vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere; evitando así, la toxicidad potencial de una sobredosis de vitamina A. Por otra parte, muchos factores influyen en la absorción y utilización de provitamina A como por ejemplo la cantidad, tipo y forma física de los carotenoides en la dieta; la ingesta de grasa, vitamina E y fibra; el estado nutricional con relación a las proteínas y zinc; la existencia de ciertas enfermedades e infecciones por parásitos. Así, la biodisponibilidad de carotenoides es variable y difícil de evaluar (Rao y Rao, 2007).

## **2.8 Carotenoides provitamina A**

En humanos se ha estimado que los carotenoides provitamina A contribuyen con el 40 - 80% de la vitamina A que se suministra al cuerpo.

Los  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$  carotenos, así como, la criptoxantina, son los carotenoides provitamina A más importantes por su cantidad. Aunque pareciera que una molécula de  $\beta$ -caroteno, produce dos de retinol, en la práctica no sucede así; 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno equivalen a 1  $\mu\text{g}$  de retinol preformado. Por ende, la cantidad total de vitamina A, en los alimentos se expresa en microgramos de equivalentes de retinol.

El anillo  $\beta$ -ionona sin sustituir y una cadena poliénica de 11 átomos de carbono son el requerimiento mínimo para la actividad provitamina A (Figura. 6), por esto el  $\beta$ -caroteno que contiene dos de estos anillos, es el carotenoide provitamina A más potente y se le asigna 100% de actividad provitamina A (Rodríguez-Amaya *et al.*, 2006) (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos representativos de carotenoides y apocarotenoides con actividad provitamina A.

Carotenoides	Actividad (%)
$\beta$ -caroteno	100
Neo- $\beta$ -caroteno	38
$\alpha$ -caroteno	50-54
Neo- $\alpha$ -caroteno	13
3, 4,-Dehidro- $\beta$ -caroteno	75
3, 4, 3'-4'-Bisdehidro- $\beta$ -caroteno	38
$\gamma$ -caroteno	42-50
7, 8'-Dihidro- $\gamma$ -caroteno	20-40
$\beta$ -caroteno-5', 6'-epoxido	21
$\alpha$ -caroteno-5, 6-epoxido	25
$\beta$ -caroteno-5, 6, 5', 6'-diepoxido	Activo
3-ceto- $\beta$ -caroteno	52
3-hidroxi- $\beta$ -caroteno	50-60
4-hidroxi- $\beta$ -caroteno	48
$\beta$ -Apo-2'-carotenal	Activo
$\beta$ -Apo-8'-carotenal	72
$\beta$ -Apo-10'-carotenal	Activo
$\beta$ -Apo-12'-carotenal	120
Licopeno	Inactivo
Luteína	Inactivo

Adaptado de Simpson (1983).

El  $\alpha$ -caroteno y el  $\gamma$ -caroteno (Figura. 3), sin embargo, no pueden convertirse en retinol en los animales con la misma eficacia que el  $\beta$ -caroteno, ya que el anillo  $\epsilon$  del  $\alpha$ -caroteno no puede convertirse en el organismo en  $\beta$ -ionona, y la estructura abierta de la cadena del  $\gamma$ -caroteno no puede hacerse cíclica en los animales. Es por ello por lo que el  $\alpha$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno se transforman en retinol con la mitad de eficiencia que el  $\beta$ -caroteno. La actividad biológica del anillo de  $\beta$ -ionona en los carotenos cesa por la introducción de un grupo hidroxilo. La  $\beta$ -criptoxantina (Figura. 6), con un anillo de  $\beta$ -ionona sustituido por un hidroxilo y el otro intacto, tiene la misma actividad provitamínica A que  $\alpha$ - y  $\gamma$ -caroteno. La luteína (Figura. 6) tiene dos anillos de  $\beta$ -ionona hidroxilados, por lo que no actúa como provitamina A. (Yeun *et al.*, 2002).

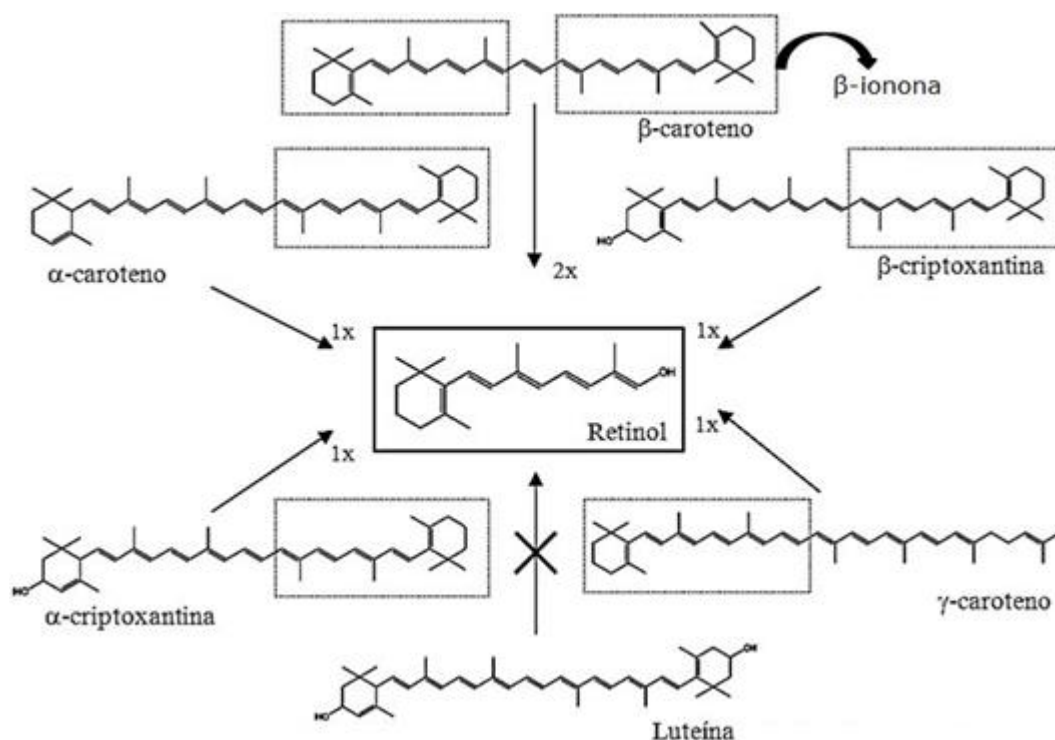


Figura 6. Estructuras de los carotenoides con actividad provitamina A, a excepción de la luteína.

Nutricionalmente el carotenoide provitamínico más importante es el  $\beta$ -caroteno, que se definía hasta hace poco como el que tenía 1/6 de la actividad de retinol. En realidad, resulta bastante difícil hacer una estimación exacta de los equivalentes de retinol, ya que la biodisponibilidad de los carotenoides, provitamínicos o no, depende de una serie de factores, como por ejemplo el tipo de carotenoide, la matriz en la que se encuentran, el procesamiento de alimento, interacción con otros carotenoides, así como con la grasa y la fibra, status nutricional, edad e infección por parásitos (Yeun *et al.*, 2002). Debido a todo ello, existe una importante controversia en torno a la utilidad de estos equivalentes (Scott *et al.*, 2000). No obstante, en la actualidad, el comité que fija los niveles de ingesta de referencia (Dietary Reference Intake Committee) considera que un equivalente de retinol equivale a **12  $\mu\text{g}$**  de  $\beta$ -caroteno o a **24  $\mu\text{g}$**  de otros carotenoides

provitamínicos (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, D.C. National Academy Press; 2002). La molécula de  $\beta$ -caroteno es, en realidad, una estructura doble del retinol y, teóricamente, su división debería dar lugar a dos moléculas de retinol. La disparidad entre la estructura química y la actividad biológica del  $\beta$ -caroteno se debe, en parte, a la absorción incompleta y, en parte, a la falta de estequiometría de la reacción, debido a la formación de metabolitos oxidados de retinol. Con relación a esto cabe decir que, por ejemplo, los carotenoides ingeridos con los alimentos se absorben en menor grado que los carotenoides puros, por lo que los factores de conversión van a depender de la procedencia de los carotenoides (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, D.C. National Academy Press; 2000).

Además, en estos pigmentos cabe la posibilidad de isomería cis/trans, presentando los isómeros cis menor actividad como provitamina A que las formas trans (Yeun *et al.*, 2002).

Como la actividad de vitamina A del  $\beta$ -caroteno presente en los alimentos de forma natural es una doceava parte de la del retinol (vitamina A preformada). Por lo tanto, se necesitarían 12 microgramos de  $\beta$ -caroteno de los alimentos para obtener el equivalente a 1 microgramo (0,001 mg) de retinol. (Yeun K-J *et al.*, 2002).

La actividad vitamínica A se expresa en forma de **equivalentes de retinol (ER)** (se mide en microgramos) incluyendo el retinol y la contribución de los carotenos:

Tabla 4. Equivalentes de retinol (ER).

1 ER	=	1 µg de retinol
	=	6 µg de β-caroteno (Actualmente se estima en 12 µg de β-caroteno)
	=	12 µg de otros carotenoides precursores de vitamina A 24 µg de β-criptoxantina

(Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Beta-carotene and other carotenoids. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, D.C.: National Academy Press; 2000:325–400).

### 2.8.1 Conversión de β-caroteno a Vitamina A

Se han propuesto dos vías oxidativas (Figura. 7) para la conversión de β-caroteno a vitamina A:

1) Ruptura central, la cual ocurre en el doble enlace central 15, 15'. El producto de este tipo de división son dos moléculas de retinal debido a la actividad enzimática de la BCO1.

2) Ruptura excéntrica, que puede ocurrir en uno o más de los otros dobles enlaces. Sus productos pueden ser un β-apo-carotenal largo y otro corto; por ejemplo, ciclocitral y β-apo-8'-carotenal, si acaso la ruptura ocurriera en el doble enlace 8'. Experimentalmente se ha demostrado que los β-apocarotenales pueden ser convertidos a β-caroteno. La enzima responsable se denomina β-caroteno 9',10'-oxigenasa (BCO2) (Mora y Shimada, 2001; Kloer y Schulz, 2006; Fierce *et al.*, 2008).

(Allen y Hayaishi, 1965), encontraron que la enzima requiere oxígeno para llevar a cabo la reacción por lo que tentativamente la denominaron como β-caroteno 15, 15' oxigenasa.

(Wyss, 2004) menciona que la primera denominación formal de la enzima que produce escisión del β, β-caroteno, fue β-caroteno 15, 15' dioxigenasa (EC 1.13.11.21), tratándose de un mecanismo de dioxigenasa.

En trabajos, como los de (Leuenberger *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2002), al usar una preparación de  $\beta$ -caroteno 15, 15' dioxigenasa parcialmente purificada de intestino de pollo y  $\beta$ -caroteno, se mostró que sólo una molécula de oxígeno es incorporada en cada una de las moléculas de retinal producidas. Como resultado, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular cambió la clasificación de esta enzima a EC 1.14.99.36 y su denominación a  $\beta$ -caroteno 15, 15' oxigenasa (Leuenberger *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2002).

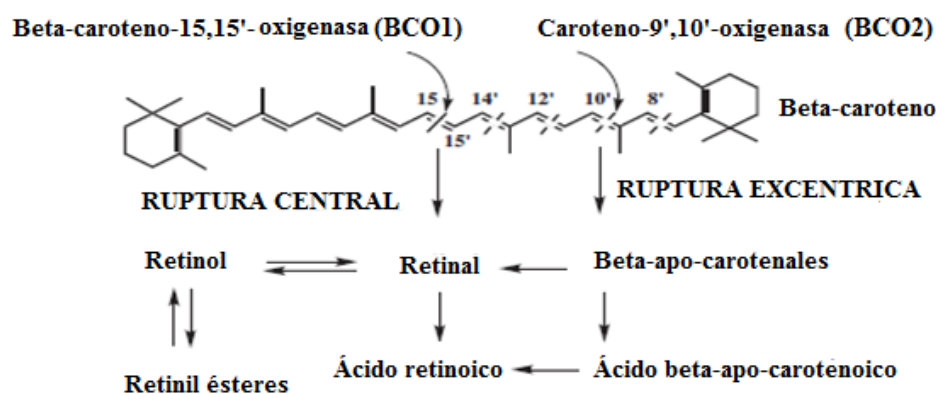


Figura 7. Las principales vías oxidativas en el metabolismo del  $\beta$ -caroteno, división central y excéntrica.

Para determinar la ubicación de la BCO1 se realizó inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que esta enzima se expresa en células epiteliales en varios tejidos, incluyendo retina, células glandulares y de mucosa de estómago, intestino delgado, hígado, próstata, endometrio, tejido mamario, células tubulares de riñón, piel, testículo, ovario, glándula adrenal, colon, así como células de músculo esquelético (Kim *et al.*, 2009; Kim y Oh, 2010; Lietz *et al.*, 2010); de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, cabras y

bovinos (Mora y Shimada, 2001). Las células epiteliales en general son sensibles a la deficiencia de vitamina A, por lo que la actividad de la BCO1 puede ser de gran importancia para este tipo celular (Von Lintig, 2010).

## **2.9 Generalidades de la Vitamina A**

Vitamina A es el término genérico reservado para cualquier componente que posea la actividad biológica de retinol, mientras que el término retinoide incluye tanto las formas naturales de la vitamina A como todas las formas sintéticas de análogos de retinol con o sin actividad biológica.

La vitamina A es un nutriente esencial para los seres humanos ya que no puede ser sintetizado por el cuerpo. Se obtiene a partir de la dieta en dos formas, vitamina A preformada, encontrada de forma natural en productos de origen animal y los carotenoides precursores de vitamina A, que se encuentran principalmente en alimentos de origen vegetal (Bennasir *et al.*, 2010)

El todo trans-retinol, principal componente retinoide, es un alcohol primario con un peso molecular de 286. En la mayoría de los tejidos naturales, el retinoide predominante es el retinil palmitato, aunque también se pueden encontrar el retinol unido a otros ácidos grasos, como el retinil oleato y el retinil estearato. Gran parte de estos metabolitos se dan en la configuración de todo-trans y el ácido retinoico 9-cis, son metabolitos activos del retinol encontrados en la mayoría de los tejidos.

En cuanto a las propiedades físicas, la mayoría de las formas de vitamina A son compuestos cristalinos con un punto de fusión relativamente bajo y debido a su estructura presentan un espectro de absorción característico que se utiliza para su identificación. Por sus propiedades fisicoquímicas, esta vitamina es estable al



tratamiento térmico moderado, así como a los agentes reductores y al medio alcalino. Sin embargo, es muy sensible a la luz, la oxidación, la isomerización y la polimerización, debido a su estructura de dobles enlaces conjugados. En general, los ésteres son más estables que las formas alcohólicas y los carotenoides son menos estables que los retinoides, (Gil, 2010).

### **2.9.1 Fuentes de alimentación**

La vitamina preformada se encuentra únicamente en alimentos de origen animal, ya sea en sitios de almacenamiento, como el hígado, o relacionada con la grasa de la leche y los huevos; en concentraciones altas se puede encontrar en el aceite de bacalao y de pez hipogloso. (Mahan y Escott, 2001). Los carotenoides provitamina A se encuentran en verduras oscuras, o de hojas amarillas naranja y en frutas, los colores más intensos se relacionan con mayores concentraciones de carotenoides.

La mayor parte de vitamina A alimentaria la aportan los carotenoides. Las zanahorias, sopas de verduras, vegetales de hojas verdes y mixtas, espinaca, ensalada verde, jugo de naranja, camote, estofado de res y el melón constituyen las diez fuentes máximas de provitamina A. (Mahan y Escott, 2001).

### **2.9.2 Funciones de la vitamina A**

A la vitamina A se le han atribuido varias funciones, algunas se presentan a continuación:

Es esencial para la estimulación del crecimiento y un adecuado desarrollo del tejido esquelético, para la reproducción normal, función y mantenimiento de la visión, y lo

más importante, para la preservación de las funciones diferenciadas de los tejidos secretores de la mucosa epitelial. (Bennasir *et al.*, 2010)

La vitamina A contribuye en la prevención de enfermedades infecciosas, especialmente del aparato respiratorio creando barreras protectoras contra diferentes microorganismos. Estimula las funciones inmunes, entre ellas la respuesta de los anticuerpos y la actividad de varias células, producidas por la medula ósea, que interviene en la defensa del organismo como fagocitos y linfocitos. Por ello, promueve la reparación de tejidos infectados y aumenta la resistencia a la infección.

En el proceso visual, la vitamina A, en su forma de aldehído, retinal, se une como cromóforo a los pigmentos fotosensibles rodopsina e iodopsina.

La deficiencia de vitamina A causa una reducción en la síntesis de rodopsina, creando así problemas para la adaptación a la oscuridad. Varias reacciones, incluyendo oxidación o reducción y cambios en la configuración de la molécula, se llevan a cabo durante el ciclo visual. La vitamina A se almacena como ésteres de ácidos grasos de cadena larga en el epitelio del pigmento de la retina, que en los humanos contiene la mayor concentración de vitamina A después del hígado (Bennasir *et al.*, 2010).

A parte de su función en la visión, está involucrada en la biosíntesis de glicoproteínas que son constituyentes comunes a los sistemas de membrana y juegan un papel clave en muchos procesos biológicos tales como la recepción de hormonas específicas, comunicación intercelular y adhesión, crecimiento celular, y metabolismo de lipoproteínas (Shintani, 2013).

Evidencias experimentales han demostrado que los retinoides poseen propiedades antineoplásicas, inhibiendo tanto la etapa de transformación como de promoción de procesos neoplásicos.

De acuerdo con lo citado anteriormente, la vitamina A se cataloga como un nutriente esencial, sin el cual no se podrían llevar a cabo muchos procesos biológicos, haciéndolo indispensable para la vida y el funcionamiento adecuado de los diferentes procesos vitales. (Shintani, 2013).

### **2.9.3 Deficiencia de vitamina A**

La deficiencia de vitamina A es un grave problema de salud pública, probablemente la más importante causa de ceguera evitable entre los niños en los países en desarrollo. La deficiencia marginal es un factor importante en la susceptibilidad de la infancia a la infección y por lo tanto la morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo; incluso en países desarrollados, la vitamina A (junto con el hierro) es el nutriente de más probabilidad de ser suministrados en cantidades deficientes (Bennasir *et al.*, (2010).

La deficiencia de vitamina A es usualmente resultado de malnutrición, pero también puede ser atribuida a anormalidades en la absorción del retinol en el intestino o de carotenoides (Sommer, 2008).

Los signos más prominentes de deficiencia son ceguera nocturna y xeroftalmia, que consiste en cambios severos progresivos que afectan la conjuntiva y córnea del ojo. Otros signos de deficiencia, reportados primero en modelos animales, incluyen pérdida del apetito, hiperqueratosis, susceptibilidad aumentada a infecciones, metaplasia y queratinización de las células epiteliales del tracto respiratorio y otros órganos, y la percepción anormal del color. En la deficiencia aguda de vitamina A, la córnea puede ser perforada y resultar en ceguera (Sommer, 2008).

#### **2.9.4 Digestión de la vitamina A**

La mayor cantidad dietaria de vitamina A preformada se encuentra en el organismo como ácidos grasos de cadena larga unidos mediante enlace éster al retinol. Estas cadenas de ésteres de retinol deben ser hidrolizadas antes de ser absorbidas en el lumen intestinal, dicha hidrolización es catalizada por enzimas pancreáticas y por aquellas enzimas asociadas directamente a las células intestinales. (Harrison, 2005).

La hidrólisis de los ésteres de retinol en el lumen intestinal es catalizada por enzimas tales como la enzima pancreática triglicérido lipasa y la fosfolipasa B del borde de cepillo, para producir retinol intestinal no esterificado, que es la forma en la cual se absorbe en la célula de la mucosa intestinal. (Harrison, 2005).

La presencia de grasa en el intestino puede estimular la digestión de los ésteres de retinol mediante: a) La estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas b) Estimulación de la secreción de sales biliares que sirven para la formación de micelas de lípidos y c) proporcionando productos de la digestión lipídica (fosfolípidos, monoglicéridos y ácidos grasos libres) que en sí mismos pueden servir como componentes de micelas. (Harrison, 2005; D'Ambrosio *et al.*, 2011).

#### **2.9.5 Absorción y transporte de vitamina A**

La eficiencia en la absorción de carotenoides es relativamente baja en términos generales (10% a 30%), y disminuye significativamente con el aumento en la ingesta de los mismos. La grasa dietaria es un factor crítico para la absorción, ya que los carotenoides sólo se absorben en presencia de sales biliares y con la adecuada suspensión en micelas (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

Una vez se han hidrolizado los ésteres de retinol, la célula de la mucosa absorbe el retinol libre para posteriormente ser re-esterificado con cadenas largas, principalmente de ácidos grasos saturados, mediante la enzima Lecitina Retinol Acil-transferasa (LRAT). Los ésteres de retinol restantes se incorporan, junto con otros ésteres de lípidos neutros (triacilglicerol y ésteres de colesterol) a los quilomicrones y se absorben vía linfática. En el compartimiento vascular, gran cantidad del triacilglicerol proveniente del quilomicron es hidrolizado por la lipoproteína lipasa en los tejidos extra hepáticos, como resultado de ésta se producen los remanentes de quilomicron que contiene la mayor cantidad de ésteres de retinol absorbidos (D'Ambrosio *et al.*, 2011). La figura 8 muestra una visión general de la digestión y absorción de la vitamina A.

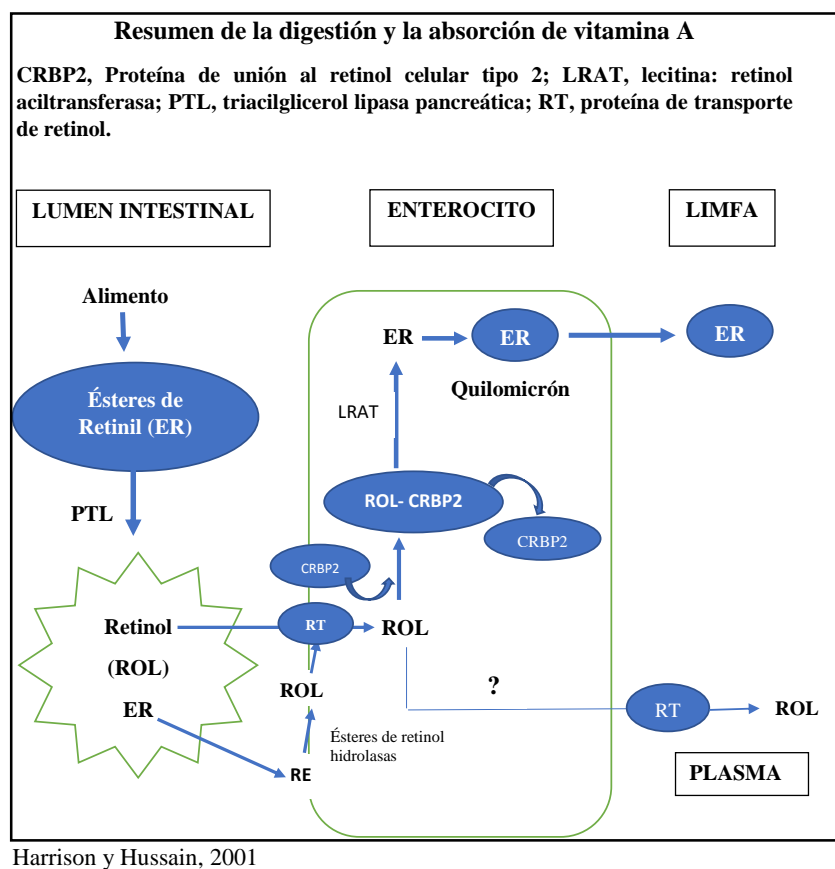


Figura 8. Una visión general de la digestión y absorción de la vitamina A.

### 2.9.6 Vitamina A en tejidos

Los tejidos obtienen retinol de holo-RBP (Proteína fijadora de retinol) durante todo el día y ésteres de retinilo de quilomicrones y quilomicrones remanentes después del consumo de comidas que contienen vitamina A. Aunque la mayoría de la vitamina A del cuerpo se almacena en el hígado, muchos órganos contienen pequeñas reservas de ésteres de retinilo. (Batten *et al.*, 2004).

Los quilomicrones remanentes son importantes en la entrega directa de los ésteres de retinol a tejidos como la médula y el bazo ya que en estos tejidos se dan importantes procesos de proliferación celular y diferenciación, En las células leucémicas mieloides se ha visto cómo los quilomicrones aportan ésteres de retinol inhibiendo la proliferación celular e induciendo la diferenciación de esas células. (Batten *et al.*, 2004).

En el hígado, las células parenquimales (hepatocitos) son responsables de la incorporación de los ésteres de retinol, estos son hidrolizados en la membrana plasmática o en los endosomas tempranos por una hidrolasa de ésteres de retinol liberando retinol, que es transferido al retículo endoplásmico; dentro del retículo endoplásmico el retinol se acompleja con una proteína fijadora de retinol (RBP) que se encuentra a alta concentración. El complejo RBP-retinol se transloca al aparato de golgi, se secreta y se exporta a las células estrelladas hepáticas. (Batten *et al.*, 2004).

Esa transferencia es bastante específica y ya en las células estrelladas el retinol vuelve a ser re-esterificado a ésteres de retinol. En mamíferos más del 80% del total de vitamina A es almacenado en las células estrelladas hepáticas en forma de ésteres de retinol; esa reserva es suficiente en humanos al menos durante varios meses. Las células estrelladas almacenan ésteres de retinol en grandes gotas lipídicas citoplasmáticas, donde el tamaño y número de las cuales depende de la cantidad de vitamina A presente.

Las células estrelladas se encuentran también en el intestino, riñón, corazón, ovarios y testículo donde también funcionan como almacenadoras de cantidades elevadas de retinol. (Batten *et al.*, 2004).

## **2.10 Método biológico para la determinación de actividad provitamina A**

El análisis de las vitaminas en los alimentos es un gran desafío para los analistas dado que se asocia con problemas significativos. Muchos de estos problemas han sido eliminados gracias a los recientes avances en la tecnología y el desarrollo de nuevos enfoques analíticos. Todos los antiguos métodos biológicos utilizados para determinar o incluso demostrar la actividad biológica de las vitaminas, han sido en la actualidad reemplazados por métodos microbiológicos. Los métodos fisicoquímicos, principalmente la cromatografía gas líquido (CGL) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) han sido aplicados para solucionar muchos problemas relacionados con el análisis de las vitaminas. (Carrillo-López, 2010).

En la actualidad se emplean varios métodos, pero ninguno puede considerarse simple y sensible a la vez, y todos están sometidos a interferencias de otras sustancias en la sangre y el hígado. Para ensayos biológicos se utilizan principalmente ratas. Las ratas machos son más sensibles a la deficiencia de la vitamina A, que las hembras; la edad de los animales experimentales debe ser de 20 a 22 días, y su peso no debe exceder de 30 a 40 g.

En investigaciones se ha señalado el sinergismo entre la vitamina A y el tocoferol. Así, a través de la presencia de tocoferol se ejerce una influencia favorable sobre el almacenamiento de vitamina A. (Carrillo-López, 2010).

Generalmente, los animales alimentados con una dieta libre de vitamina A son aptos para la prueba después de 6 a 7 semanas, se evidencia el cese en el crecimiento y aparecen los primeros síntomas de xeroftalmia. En todos los experimentos, las pruebas en paralelo con un estándar de vitamina A, es esencial. Durante el período de prueba el estándar de vitamina A y las muestras examinadas deben ser suministrados diariamente, y el crecimiento y el aumento de peso de los animales deben ser observados al menos por 4 semanas. Solo los animales del mismo sexo son comparables (Carrillo-López, 2010).

#### **2.10.1 Saponificación y extracción**

La mayoría de los procedimientos de análisis están utilizando una etapa de saponificación antes de la extracción con un solvente orgánico adecuado. Una comparación de los métodos basada en los datos obtenidos en un estudio colaborativo revela que las condiciones para la saponificación pueden variar dentro de ciertos límites sin afectar los resultados. En generalmente 2-10 g de la muestra se saponifican preferentemente bajo nitrógeno utilizando una mezcla de hidróxido de potasio acuoso, etanol o metanol, agua y con la adición de un antioxidante como ácido ascórbico, pirogalol o BHT. Los antioxidantes deberían ser agregados a la muestra antes de la adición de la solución de hidróxido de potasio. La tabla 5, muestra un ejemplo de la proporción de estos reactivos. (Shintani. *et al.*, 2013).



Tabla 5. Proporción de reactivos para saponificación.

Peso de la muestra (g)	Alcohol (mL)	Ácido ascórbico	Hidróxido de potasio
2-5	50 (metanol)	0.25g	5 mL (50%)
5-10	100 (etanol)	1.0 g (+0.04 Na <sub>2</sub> S)	12g (+20 mL de agua)
10-20	150 (etanol)	1.0g	50 mL (80%)

El tiempo normal de saponificación es entre 15-45 minutos con temperaturas que fluctúan de 80 a 100°C (reflujo).

La vitamina A es extraída de la solución de saponificación por medio de un solvente adecuado, por ejemplo: éter dietílico, tertbutil metil éter, n-hexano 3 a 4 veces, con volúmenes que fluctúan de 50-150 mL. Los extractos combinados son lavados a pH neutro con agua (2-4 veces, 50-150 mL). (Shintani *et al.*, 2013).

### 2.10.2 Evaporación y dilución

Se agregan aproximadamente 2-5mg de BHT al extracto antes de la evaporación utilizando un evaporador rotatorio bajo un vacío parcial y a una temperatura que no exceda 50°C Deben tomarse medidas para remover restos de agua tales como secar con sulfato de sodio, o destilación azeotrópica con etanol o tolueno o el uso de papel filtro para separación de fases.

El residuo es redissuelto utilizando de preferencia la fase móvil u otro solvente compatible con HPLC de tal modo de obtener una concentración apropiada para la inyección dentro de la columna de HPLC. Esta la solución final de la muestra. (Shintani *et al.*, 2013).

### **2.10.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Principalmente, pueden utilizarse dos modos de cromatografía (fase normal y fase reversa) para la cuantificación de la vitamina A. La tabla 6, muestra dos procedimientos de trabajo a partir de las múltiples posibilidades que existen para lograr buenas separaciones.

Los estándares y soluciones estándares deberían controlarse espectrométricamente en cuanto a la pureza y la concentración corregida debería utilizarse para el cálculo.

En algunos de los sistemas cromatográficos, se logra una separación entre el retinol "sólo trans" y el 13-cis retinol. En estos casos, los resultados deberían informarse como equivalentes de retinol "sólo trans" lo cual es la suma del retinol "sólo-trans" y el 13-cis retinol después de corregir considerando la menor biopotencia (75% del retinol "sólo-trans").

Es importante indicar claramente las unidades utilizadas para informar los resultados. (Lacramiora *et al.*, 2014).

Tabla 6. Condiciones de los sistemas de cromatografía para vitamina A.

	<b>Sistema de Fase Normal (FN)</b>	<b>Sistema de Fase Reversa (FR)</b>
<b>Columna</b>	Acero inoxidable: 125 x 4.0 nm	Acero inoxidable: 250 x 4.0 nm
<b>Fase estacionaria</b>	Lichrosorb Si 60 (Merck); 5 µm	Hypersil ODS (Shandon); 5 µm
<b>Fase móvil</b>	n-hexano: 2-propanol (98:2)	Metanol: H <sub>2</sub> O (93:7)
<b>Flujo</b>	1.0 mL/min	0.8 mL/min
<b>Presión</b>	35 bar	60 bar
<b>Volumen de Inyección</b>	20-50 µL	20 µL
<b>Detección</b>	Fluorescencia: Em: 470 nm Ex:325 nm	UV: 325 nm
<b>Tiempo de retención</b>	Aprox. 6 min	Aprox. 5 min
<b>Estándar</b>	Aprox. 2 µg/mL (6,6 UI/mL)	Aprox. 2 µg/mL (6,6 UI/mL)
<b>Cálculo</b>	Método de estándar externo; Recuento de área o altura	Método de estándar externo; Recuento de área o altura

## 2.11 Determinación bioquímica de retinol en sangre.

La cuantificación de la concentración de retinol plasmático se realiza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según el método desarrollado por el International Vitamin A Consultive Group y estandarizado para vitamina A. Este método posee gran reproducibilidad, es muy preciso y específico y es de elección para la determinación de estas vitaminas por su alta sensibilidad. Se utiliza la modalidad cromatográfica conocida como cromatografía líquida de fase reversa, la cual consiste en la partición de la muestra entre una fase estacionaria hidrofóbica (frecuentemente cadenas C-18 enlazadas covalentemente a partículas de sílica) y una fase móvil más polar. El tiempo en el cual los compuestos de la muestra eluyen depende de la polaridad: los componentes polares eluyen antes que los componentes menos polares.

La detección de los componentes separados por HPLC se realiza espectrofotométricamente, (rango UV para retinol y acetato de retinol). La cuantificación de los componentes se logra por comparación de las alturas de los picos con las de los estándares (analítico y estándar interno). La adición de un estándar interno (all *trans* acetato de retinol) ayuda a la corrección por pérdidas durante la extracción y el análisis (Marquéz *et al.*, 2002; Fallah y Peighambaroust, 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las enfermedades crónicas no transmisibles ocupan unos de los primeros lugares en causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Así pues, es importante conocer y estudiar acerca de todos los factores que permiten de cierto modo contribuir al tratamiento o prevención de condiciones que pongan en peligro la vida del ser humano.

La deficiencia de vitamina A es un problema nutricional importante en países en desarrollo, afecta especialmente a niños (75 a 140 millones de niños son deficientes en vitamina A) en más de 100 países.

En los países en desarrollo, los carotenoides de las frutas y vegetales aportan el 70% de la ingesta de vitamina A. Por tal motivo, es importante conocer el contenido de carotenoides provitamina A de los alimentos disponibles, principalmente en las poblaciones más vulnerables.

En nuestro país existe una gran diversidad de frutas y vegetales ricos en carotenoides, algunos de ellos ya han sido estudiados y se conocen sus propiedades, pero muchas frutas no han sido estudiadas aún y en ellas podemos encontrar carotenoides no estudiados hasta el momento.

Debido a que la sapotexantina ( $\beta,\kappa$ -caroten-6'-ona) y la criptocapsina ((3'S,5'R)-3'-Hidroxi- $\beta,\kappa$ -caroten-6'-ona) son carotenoides que se han encontrado recientemente en altas concentraciones en el mamey (*Pouteria sapota*), esto nos ha llevado a seleccionarlo como la fuente para su obtención en el presente estudio.

Anteriormente no se había estudiado actividad provitamina A de carotenoides  $\beta$ - $\kappa$ , debido a que la única fuente de criptocapsina que se conocía era el pimentón rojo, encontrado en cantidades trazas.

La importancia de este estudio radica en demostrar que los carotenoides  $\beta$ - $\kappa$  pueden ser transformados en vitamina A por mamíferos, para estimar el potencial provitamina A de los alimentos que contienen carotenoides con esta característica estructural.

Además, por sus funciones protectoras contra enfermedades crónicas y degenerativas, es importante conocer la especificidad que tienen ciertos tejidos para acumular carotenoides  $\beta$ - $\kappa$ .

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- 4.1.1 Demostrar que los carotenoides  $\beta, \kappa$  poseen actividad provitamina A *in vivo*.

### **4.2. Objetivos específicos**

- 4.2.1. Aislar sapotexantina y criptocapsina del mamey en cantidad suficiente para ensayar su actividad provitamina A en ratas.
- 4.2.2. Evaluar la deposición de vitamina A en hígado de ratas alimentadas con sapotexantina y criptocapsina, comparando con  $\beta$ -caroteno.
- 4.2.3. Relacionar la deposición de vitamina A en hígado con la cantidad de  $\beta$ -caroteno, criptocapsina y sapotexantina ingerida por los animales experimentales (eficacia).
- 4.2.4. Comparar la deposición de  $\beta$ -caroteno, criptocapsina y sapotexantina en tejidos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Aislamiento y purificación de los carotenoides

#### 5.1.1. Carotenoides

Esta es la primera vez que sapotexantina y criptocapsina se utilizan en ensayos con animales. Estos carotenoides no se encuentran disponibles comercialmente y en nuestro ensayo se necesitaban cantidades relativamente altas. Por este motivo, describiremos algunos detalles del aislamiento, aplicando básicamente las recomendaciones sugeridas por (Rodríguez-Amaya *et al.*, 2004 y Britton *et al.*, 1995).

#### 5.1.2. Extracción y saponificación de carotenoides

Los extractos ricos en sapotexantina y criptocapsina fueron obtenidos de mamey rojo (*Pouteria sapota*) (figura 9a) y el de  $\beta$ -caroteno de camote (*Ipomoea batata*) (figura 9b). Ocho kilogramos de pulpa de mamey rojo fueron extraídos varias veces con acetona, hasta no obtener color. El extracto cetónico fue concentrado por evaporación al vacío, disuelto en un volumen de hexano:éter dietílico (2:1) y los carotenoides pasados a la fase orgánica (superior). Todo el solvente fue eliminado por evaporación al vacío. El residuo fue disuelto en 150 mL de éter dietílico y 150 mL de KOH metanólico 5% y la mezcla mantenida en la oscuridad por 3 horas, para la saponificación. El extracto saponificado fue lavado cuatro veces con NaCl 5%, para eliminar el KOH y guardado a -20°C hasta su uso. El extracto rico en  $\beta$ -caroteno fue preparado utilizando cuatro kilos de pulpa fresca de camote, siguiendo el procedimiento



ya descrito para mamey rojo, pero omitiendo la saponificación, ya que el camote no contiene xantófilas esterificadas.

#### 5.1.3. Aislamiento de sapotexantina, criptocapsina y $\beta$ -caroteno

Los carotenoides fueron aislados por cromatografía de columna abierta, utilizando una columna 6 x 35 cm (ID x large) empacada con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  neutro, Brokman grado III. Todas las fracciones se evaluaron por HPLC-DAD, con columna 30, bajo las condiciones descritas en trabajos previos (Murillo *et al.*; 2011 y Murillo *et al.*; 2016), utilizando un cromatógrafo Agilent 1050, con detector de arreglo de diodos (DAD), siguiendo los procedimientos descritos por Britton (Britton *et al.*; 1995). Del extracto de mamey rojo saponificado se obtuvieron las fracciones A y B, que eluyen con 10% y 50% de éter en n-hexano respectivamente. La fracción A es rica en sapotexantina y la B rica en criptocapsina. Para aumentar la pureza, ambas fracciones fueron re-cromatografiadas, con cantidades crecientes de éter en n-hexano. En la fracción 3% éter eluyen 116 mg de all-E-sapotexantina, con pureza de 95% y en la fracción 40% éter eluyen 147 mg de all-E-criptocapsina 92% puro. El extracto de camote fue fraccionado con n-hexano, obteniendo 123 mg de all-E- $\beta$ -caroteno 92% puro.

#### 5.1.4. Determinación del contenido de Carotenoides

El contenido de carotenoides all-E, se determinó por espectrofotometría, utilizando los coeficientes de extinción reportados en la literatura (Rodríguez-Amaya *et al.*, 2004 y Britton *et al.*, 1995) y corrigiendo por la pureza (%), obtenida por HPLC-DAD. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis

modelo UV-1203. Una dilución apropiada del extracto rico en  $\beta$ -caroteno disuelto en hexano fue leída a 450 nm y diluciones de los extractos ricos en sapotexantina y criptocapsina disueltos en benceno fueron leídas a 486 nm. Los solventes, fueron eliminados por vacío, con rotaevaporador y los extractos secos almacenados a -20 °C.

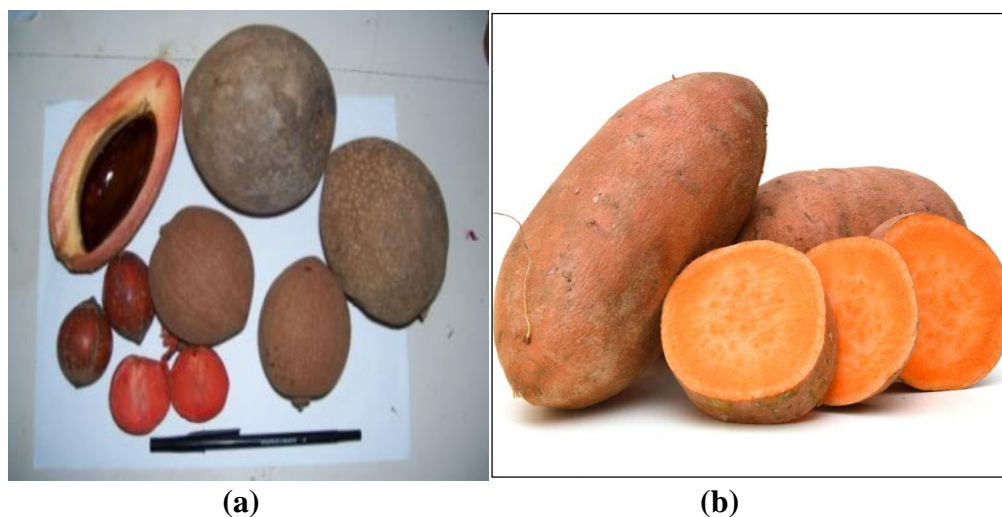


Figura 9. Frutas utilizadas para la obtención de los carotenoides de interés. (a) Mamey (*Pouteria sapota*) (b) Camote (*Ipomoea batata*).

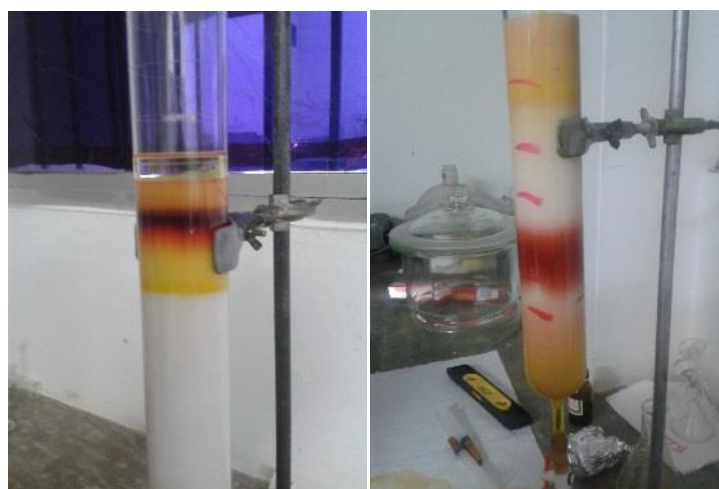


Figura 10. Separaciones por cromatografía de columna abierta empacada con  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

El contenido de carotenoides totales se calculó por la ecuación N° 1: (Britton *et al.*, 1995).

$$\chi = \frac{A * Y * 1000 * f d}{A^{1\%}_{1cm} * 100}$$

Ecuación N° 1

Dónde  $\chi$  es el peso en miligramos de muestra.

A es la absorbancia de la muestra.

Y es el volumen total de la muestra en mL.

$A^{1\%}_{1cm}$  es el coeficiente de extinción molar.

$f d$  es el factor de dilución utilizado.

## **5.2. Alimentación de los animales experimentales.**

### **5.2.1. Preparación de la mezcla oleosa**

Los extractos de los carotenoides aislados y purificados ( $\beta$ -caroteno, Sapotexantina, y Criptocapsina) se secaron y se disolvieron en 100 mL de aceite vegetal y se separaron en 30 viales, uno por cada día de alimentación. Los viales se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **5.2.2. Preparación de las raciones**

Las raciones semisintéticas, fueron preparadas según las recomendaciones del Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (American Institute of Nutrition., 1977). La ración control se preparó como se muestra en la tabla 7. Para minimizar las pérdidas de carotenoides, las raciones  $\beta$ -caroteno, sapotexantina y criptocapsina se prepararon diariamente, adicionando los carotenoides respectivos disueltos en el aceite de la ración.

Tabla 7. Composición de las raciones experimentales.

<b>Ingredientes</b>	<b>Control</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	<b>Sapotexantina</b>	<b>Criptocapsina</b>
<b>Vitaminas (%)</b>	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>Minerales (%)</b>	3.5	3.5	3.5	3.5
<b>Caseína (%)</b>	20	20	20	20
<b>Almidón (%)</b>	15	15	15	15
<b>Fibra (%)</b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>Azúcar (%)</b>	50	50	50	50
<b>Aceite (%)</b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>Cloruro de colina (%)</b>	0.5	0.5	0.5	0.5
<b><math>\beta</math>-caroteno (mg)</b>	0.0	3.57	0.0	0.0
<b>Sapotexantina (mg)</b>	0.0	0.00	3.37	0.0
<b>Criptocapsina (mg)</b>	0.0	0.00	0.00	4.28

Las mezclas de vitaminas y minerales se prepararon como se muestra en las tablas 8 y 9 respectivamente.

Tabla 8. Composición de la mezcla de vitaminas.

<b>Vitaminas</b>	<b>Por Kg</b>
<b>Tiamina.HCl</b>	600 mg
<b>Riboflavina</b>	600 mg
<b>Piridoxina.HCl</b>	700 mg
<b>Ácido Nicotínico<sup>2</sup></b>	3.00 g
<b>D-Pantotenato de Calcio</b>	1.60 g
<b>Ácido Fólico</b>	200 mg
<b>D-Biotina</b>	20.0 mg
<b>Cianocobalamina (vitamina B-12)</b>	1.00 mg
<b>dl-<math>\alpha</math>-Acetato Tocoferol (vitamina E)</b>	+ <sup>4</sup>
<b>Colecalciferol (vitamina D)</b>	2.50 mg <sup>5</sup>
<b>Menaquinona (Vitamina K)<sup>6</sup></b>	5.00 mg
<b>Sacarosa, finamente pulverizado</b>	Para hacer 1,000 g

Basado en los niveles recomendados para ratas NAS-NRC. Para ser utilizado a 1% de la dieta. <sup>2</sup>Nicotinamida es un equivalente. <sup>4</sup> como polvo estabilizado para proporcionar 5,000 IU de actividad de vitamina E. <sup>5</sup> 100,000 IU. Puede estar en forma de polvo. <sup>6</sup>Menadiona.

Tabla 9. Composición de la mezcla de minerales.

<b>Ingredientes</b>	<b>g/Kg</b>
<b>Fosfato de calcio dibásico</b>	500
<b>Cloruro de sodio</b>	74.0
<b>Citrato de potasio</b>	220
<b>Sulfato de potasio</b>	52.0
<b>Óxido de magnesio</b>	24.0
<b>Carbonato de manganeso</b>	3.50
<b>Citrato férrico</b>	6.00
<b>Carbonato de zinc</b>	1.60
<b>Carbonato cúprico</b>	0.30
<b>Iodato de potasio</b>	0.01
<b>Selenito de sodio</b>	0.01
<b>Sulfato de potasio y cromo</b>	0.55
<b>Sacarosa, finamente pulverizado</b>	Para hacer 1,000.0

Basado en los requerimientos para ratas NAS-NRC. Para ser usado a 3.5% de la dieta

### 5.2.3. Alimentación de las ratas

Para evaluar la actividad provitamina A de sapotexantina y criptocapsina y su deposición en tejidos se desarrolló un modelo experimental donde se utilizaron 24 ratas Wistar machos recién destetados, de 22 días de vida.

Los animales fueron sometidos a 4 días de adaptación, a las condiciones ambientales del laboratorio. Después de 52 días de alimentación con la dieta control, los animales fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de seis ratas cada uno y alimentados por 30 días con las raciones experimentales, cuya composición aparece en la tabla 7.

En esta etapa, se realizó un experimento de estabilidad de los carotenoides en la ración. Para esto, se prepararon raciones que contenían los carotenoides experimentales y cada dos días se determinó la concentración de carotenoides. En este ensayo se observó que el contenido de carotenoides disminuye, desde los primeros dos días. Por tal motivo, las raciones experimentales se prepararon diariamente.



Figura 11. Jaulas utilizadas en la distribución de las ratas para su alimentación con las raciones experimentales.



Figura 12. Las diferentes raciones de alimentos suministrados a las ratas. Cada carotenoide muestra un color característico.

### 5.3. Análisis de plasma y tejidos

#### 5.3.1. Obtención de las muestras de plasma y tejidos

Las ratas se anestesiaron con éter en una campana de vidrio y sacrificados sin producir ningún malestar en el animal. Luego el hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón y músculo fueron extraídos, pesados y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

La sangre fue extraída con una jeringa de 20 mL y se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de EDTA al 10 % como anticoagulante, se centrifugo y el plasma se separó y almaceno en frío, hasta el momento del análisis. (Carrillo-López *et al.*, 2010).

#### 5.3.2. Determinación de vitamina A en hígado

Para la extracción de la vitamina A se pesaron con exactitud 4 g de hígado, se homogenizaron en un mortero con 12 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 5 mL de metanol que contenía 0.1% (p/v) de ácido ascórbico. Posteriormente se pesaron 2 g del homogenizado que se traspasaron a un tubo con tapa de rosca y se le adicionaron 2 mL de KOH al 50% (p/v), se agitó la mezcla cuidadosamente y calentó a  $80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos con agitación periódica, para asegurar la digestión completa de las grasas. Los tubos se enfriaron en el chorro de agua, se colocaron en agua fría con hielo, se les adicionaron 20 mL de éter: n-hexano (50:50) (que contiene 0.01 % (p/v) de butilhidroxitolueno (BHT)), se taparon y agitaron vigorosamente en vortex por un minuto. Luego se adicionaron 15 mL de NaCl al 5% (p/v), se agitó y dejó reposar hasta la separación de dos capas. La capa superior (fase orgánica) es extraída del tubo con una pipeta Pasteur. Se realizan dos lavados más de la capa inferior (fase acuosa) con 15 mL de NaCl al 5% (p/v), las capas

superiores son unidas y llevadas a sequedad bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. El residuo fue redissuelto en 1 mL de metanol para su inyección al HPLC. (Hosotani *et al.*, 2003).

En la determinación de vitamina A por HPLC, se utilizó un cromatógrafo Líquido Agilent 1260, con detector de arreglo de diodos, provisto de una columna SUPELCOSIL LC-18, 25 cm x 4.6 mm x 5 µm. La cromatografía se desarrolló isocráticamente, utilizando como fase móvil metanol: H<sub>2</sub>O (90:10), con un flujo 1.5 mL/min y detección a 325 nm.

#### 5.3.3. Determinación de vitamina A en plasma.

Se colocaron 600 µL de plasma en tubos de poliestireno con tapa, se agregaron 600 µL de solución de ácido ascórbico al 0.1% y 600 µL de acetato de retinol (estándar interno) en etanol a una concentración de 5µg/mL, los tubos se agitaron en un vortex por un minuto. A cada tubo se agregaron 1,800 µL de hexano, se taparon los tubos y se agitaron en un vortex durante 3 minutos. Para separar las fases, se centrifugaron los tubos a 2500 r.p.m durante 10 minutos. Se separó cuantitativamente la capa orgánica y paso a un vial de vidrio. A la capa acuosa se le hicieron dos extracciones más con hexano en las mismas condiciones que a la capa anterior, y se juntaron las capas orgánicas. (Montalvo *et al.*, 2006).

Los extractos de hexano se evaporaron a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub>. El residuo se reconstituyó en 200 µL de etanol, conservando la muestra fría hasta la inyección al cromatógrafo. (Montalvo *et al.*, 2006).



Se preparó una curva de calibración utilizando patrones de retinol y acetato de retinol, como muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Datos para la elaboración de la curva de calibración.

Nº	Retinol (7000µg/dL)	Acetato de retinol (500 µg/dL)	Etanol ( µL)	H <sub>2</sub> O destilada ( µL)	Ácido ascórbico ( µL)
1	0	600	600	600	600
2	50	600	550	600	600
3	100	600	500	600	600
4	150	600	450	600	600
5	200	600	400	600	600
6	250	600	350	600	600
7	300	600	300	600	600
8	350	600	250	600	600
9	400	600	200	600	600

A cada tubo se agregaron 1,800 µL de hexano, se taparon los tubos y se agitaron en un vortex durante 3 minutos. Para separar las fases, se centrifugaron los tubos a 2500 r.p.m durante 10 minutos. Se separó cuantitativamente la capa orgánica y paso a un vial de vidrio. A la capa acuosa se le hicieron dos extracciones más con hexano en las mismas condiciones que a la capa anterior, y se juntaron las capas orgánicas.

Los extractos de hexano se evaporaron a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub>. El residuo se reconstituyo en 200 µL de etanol, conservando la muestra fría hasta la inyección al cromatógrafo. (Montalvo *et al.*, 2006).

En la determinación de vitamina A por HPLC, se utilizó un cromatógrafo modelo Agilent 1260 con detector de arreglo de diodos y longitud de onda variable, una columna SUPELCOSIL LC-18, 25 cm x 4.6 mm x 5 µm, como fase móvil metanol

100% con un flujo 1.0 mL/min, DAD 325 nm y volumen de inyección de muestra de 50 µL.

La curva estándar de calibración se utilizó para calcular la concentración de vitamina A en las muestras de plasma, junto con la relación de la altura del pico de las muestras entre la altura del pico del estándar interno de acetato de retinol. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

#### **5.4. Deposición de carotenoides en los tejidos de ratas**

Para todas las ratas, se determinó el contenido de carotenoides hepático, ya que este órgano es más grande y acumula mayor cantidad de carotenoides (se utilizaron cerca de 2.4 g). Para los otros órganos y tejidos, se preparó un homogenizado “pool” de cinco ratas. Las muestras se colocaron en un mortero, se adicionaron 50 mL de acetona, se filtró al vacío y el residuo se extrajo dos veces con 15 mL de acetona. Los filtrados unidos se pasaron a un embudo de separación, se adicionaron 60 mL de éter: n-hexano (1:1) y 60 mL de solución de NaCl al 5%, se agitó y se dejó reposar, hasta la separación clara de dos fases. La fase orgánica (superior) que contiene los carotenoides, se evaporó y concentró a un volumen pequeño. El concentrado se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía una pequeña cantidad de sulfato de sodio sólido, para eliminar el exceso de agua, se mezcló y el sobrenadante se colocó en un vial de vidrio ámbar.

#### 5.4.1. Espectrofotometría UV-Vis de los carotenoides aislados.

El extracto etéreo fue llevado a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub>, reconstituido en 2 mL de hexano y centrifugado por 5 minutos. Se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 450 nm para las muestras de  $\beta$ -caroteno y el control y a 475 nm para las muestras de sapotexantina y criptocapsina, en un espectrofotómetro UV-Vis, SHIMADZU, UV-1203, utilizando celdas de cuarzo.

#### 5.5. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos experimentalmente se analizaron estadísticamente mediante ensayo de análisis de varianza (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ). (Rubio y Berlanga., 2012).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento y purificación de los carotenoides

El  $\beta$ -caroteno fue aislado con un 92 % de pureza y siendo sus isómeros cis las principales impurezas. La sapotexantina fue aislada con 95% de pureza en donde las impurezas eran principalmente cis sapotexantina. La criptocapsina fue aislada con 92% de pureza en donde las impurezas eran cis criptocapsina y epoxicriptocapsina (sin actividad provitamina A). En la tabla 11 se presentan las cantidades aisladas de cada carotenoide. Esta es la primera vez que se aíslan cantidades relativamente altas de sapotexantina y criptocapsina, con la intención de administrarlas en raciones de animales.

Tabla 11. Cantidad de carotenoides aislados

<b>Carotenoides</b>	<b>mg</b>
Sapotexantina	116
Criptocapsina	147
$\beta$ -Caroteno	123

### 6.2. Cambio de Peso y consumo de carotenoides

En la tabla 12 se presentan los pesos de los animales, después de 30 días de alimentación con las raciones experimentales. Se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios, al inicio y después de 30 días. El peso de los animales alimentados con la ración que contenía criptocapsina, fue significativamente mayor al inicio y al final.

Tabla 12. Peso promedio en gramos de las ratas al inicio y final del periodo de alimentación con las raciones experimentales.

Grupos	Inicio	30 días
<b>Control</b>	283,3 ± 5,25 <sup>a</sup>	345,8 ± 10,03 <sup>a</sup>
<b>β-Caroteno</b>	300,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	383,3 ± 5,27 <sup>a</sup>
<b>Sapotexantina</b>	308,3 ± 5,27 <sup>a</sup>	383,3 ± 5,27 <sup>a</sup>
<b>Criptocapsina</b>	345,8 ± 11,93 <sup>b</sup>	429,2 ± 17,58 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como promedios±error estándar.  
Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferente

Los datos de consumo de alimento y el contenido de carotenoides de las raciones, nos permitieron calcular el consumo de carotenoides por animal y por grupo. La tabla 13 muestra el consumo de alimentos y carotenoides de los grupos experimentales. El análisis de varianza demostró que el grupo de criptocapsina ingirió significativamente más carotenoide. Esto, principalmente se debe a que el contenido del carotenoide en esta ración era mayor (tabla 7).

Tabla 13. Cantidad de ración y de carotenoides consumidos en 30 días.

	Control		β-caroteno		Sapotexantina		Criptocapsina	
	Ración	Carotenoide	Ración	Carotenoide	Ración	Carotenoide	Ración	Carotenoide
	(g)	(mg)	(g)	(mg)	(g)	(mg)	(g)	(mg)
1	420	0	416	14.8	480	16.2	522	22.3
2	510	0	435	15.6	490	16.5	544	23.3
3	480	0	485	17.3	469	15.8	493	21.1
4	438	0	526	18.8	493	16.6	515	22.0
5	436	0	478	17.1	491	16.6	485	20.8
6	463	0	488	17.4	518	17.5	520	22.3
	457.8 ± 13.6 <sup>a</sup>	0	471.3 ± 16.2 <sup>a,b</sup>	16.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	490.2 ± 6.7 <sup>a,b</sup>	16.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	513.2 ± 8.7 <sup>b</sup>	22.0 ± 0.4 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como promedios±error estándar.  
Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferente

### 6.3. Peso de hígado de los animales experimentales

Posterior al sacrificio de las ratas los hígados fueron extraídos y pesados. Los pesos en gramos de cada hígado son mostrados en la tabla 14, donde se observa que el peso de los hígados tiende a ser mayor para el grupo alimentado con la ración criptocapsina. Esto probablemente se debe al mayor peso de estos animales, como se observa en la tabla 12.

Tabla 14. Peso de hígado de ratas en gramos.

	Control	$\beta$ -caroteno	Sapotexantina	Criptocapsina
1	9.21	9.65	10.13	11.17
2	7.12	8.04	9.34	12.02
3	8.25	10.11	9.95	13.34
4	9.24	9.00	10.39	10.16
5	9.24	8.87	8.96	13.35
6	9.36	8.56	9.60	10.89
	$8.74 \pm 0.36^a$	$9.04 \pm 0.30^a$	$9.73 \pm 0.22^a$	$11.82 \pm 0.54^b$

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ error estándar.

Letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas.

### 6.4. Separación e identificación de retinol en extractos de hígado.

En la figura 13 se muestra el cromatograma HPLC del patrón de retinol y su espectro de absorción UV-Vis. Las figuras 14 a la 17 muestran ejemplos de los cromatogramas HPLC de extractos de hígado de los grupos experimentales, control,  $\beta$ -Caroteno, sapotexantina y criptocapsina, para identificar y cuantificar retinol (vitamina A).

Cuando se comparan los cromatogramas y espectros UV-Vis del principal pico, de las figuras 14 a la 17, con el cromatograma y espectro de la figura 13, podemos concluir que los animales alimentados con  $\beta$ -caroteno, sapotexantina y criptocapsina acumulan

cantidades importantes de vitamina A. Mientras que en animales alimentados con raciones libres de carotenoides solo se encuentran trazas de vitamina A.

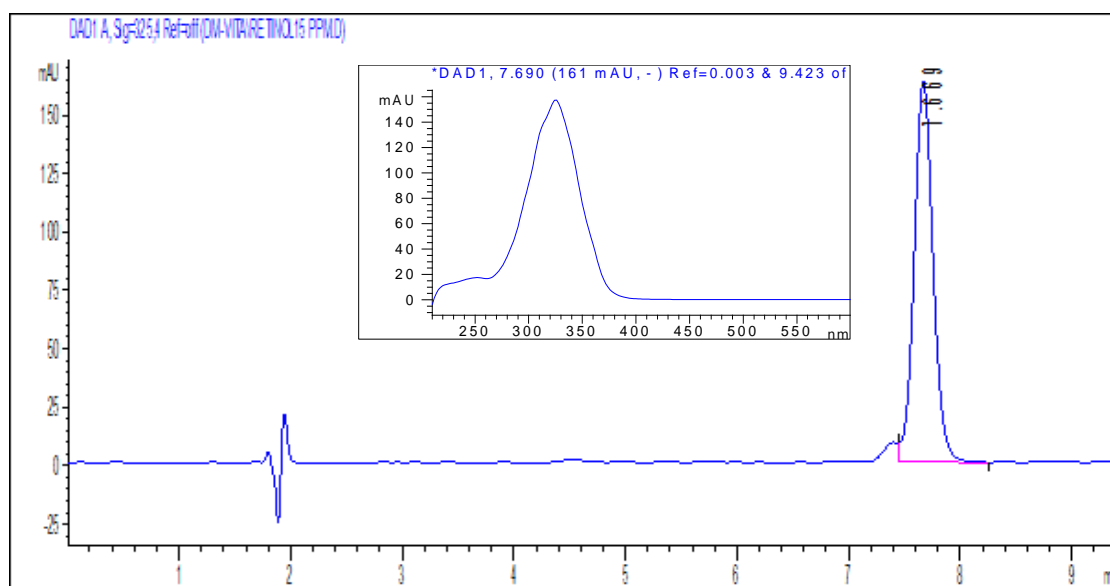


Figura 13. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del patrón de retinol

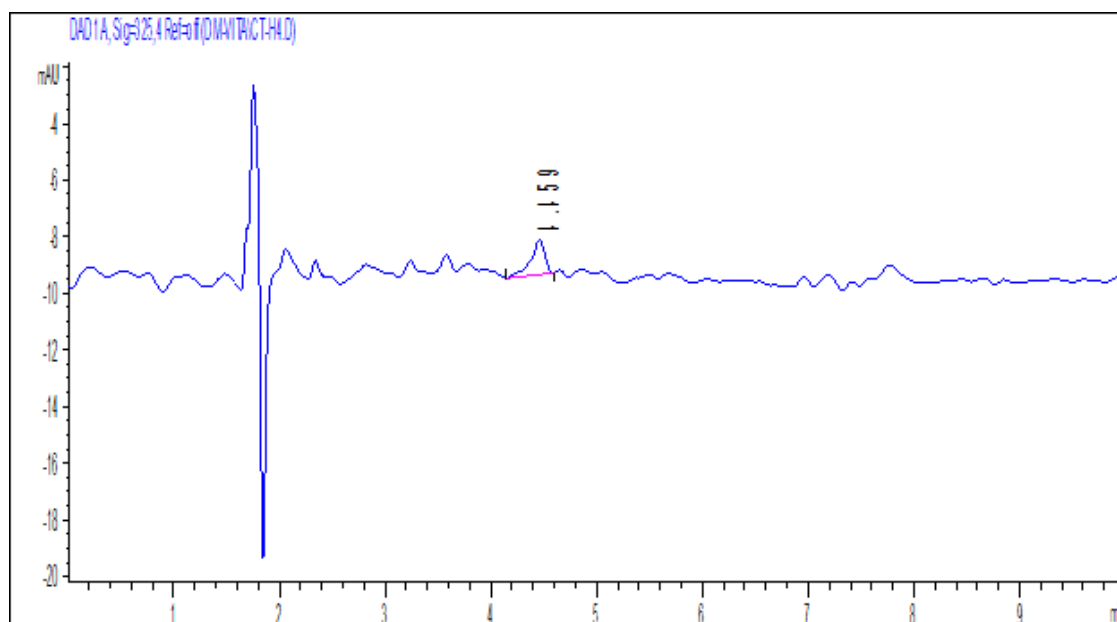


Figura 14. Cromatograma HPLC de una muestra control.

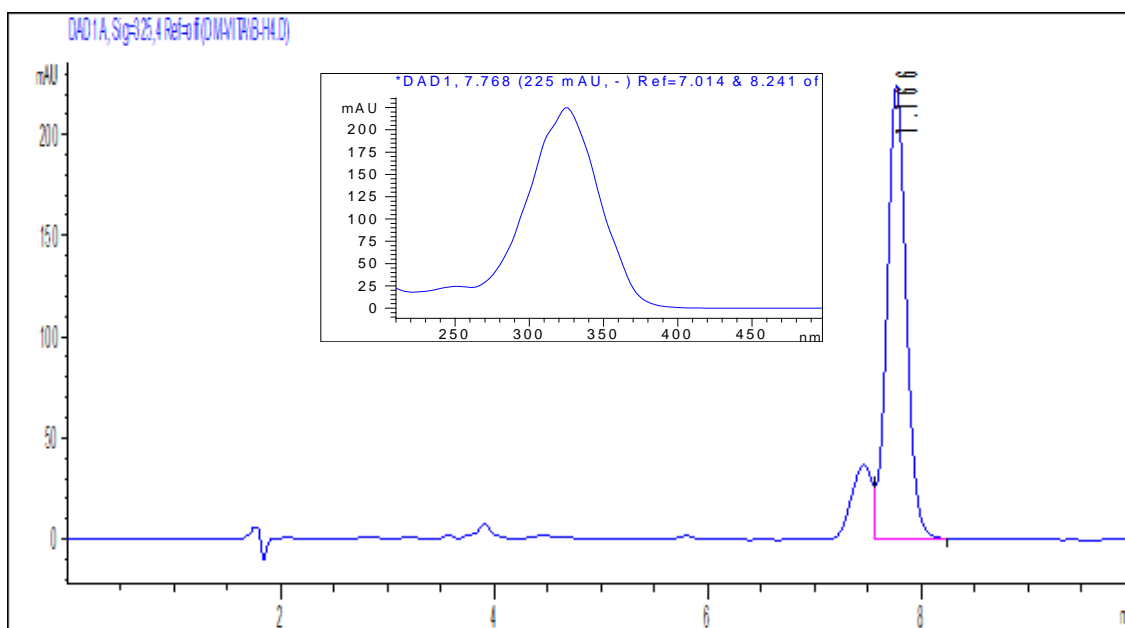


Figura 15. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del pico principal del grupo  $\beta$ -Caroteno.

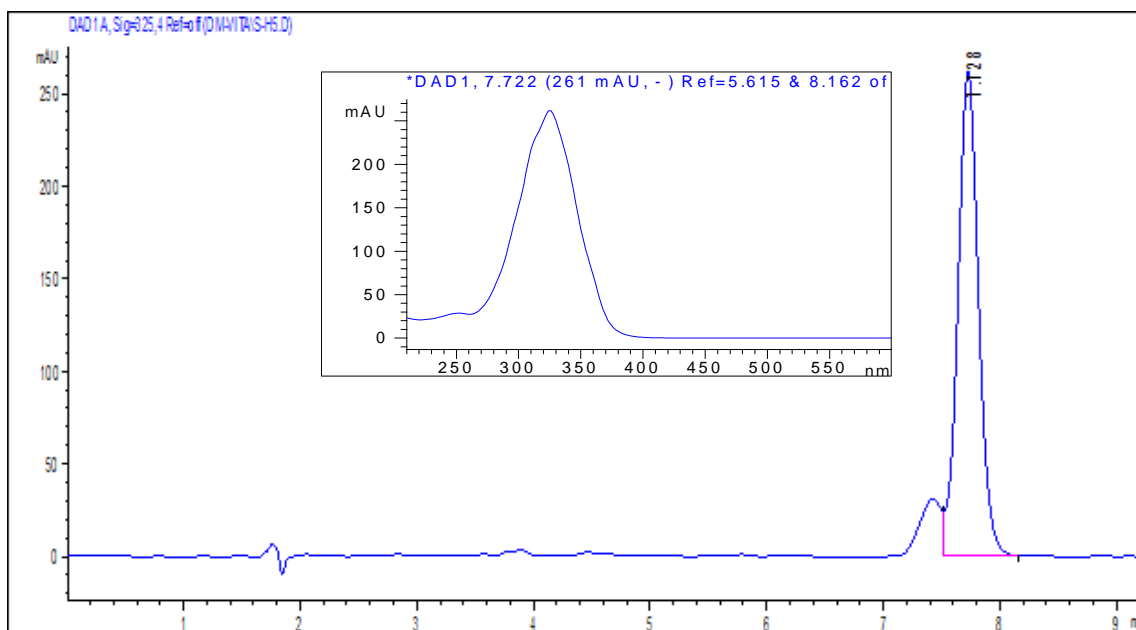


Figura 16. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del pico principal del grupo sapotexantina.



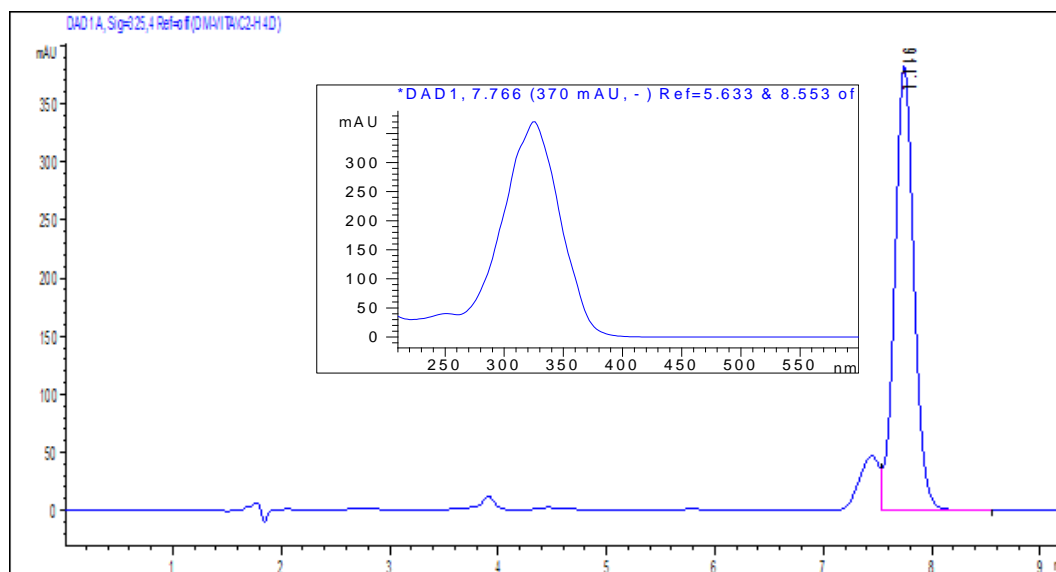


Figura 17. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis del pico principal del grupo criptocapsina.

## 6.5. Contenido de vitamina A en hígado.

La tabla 15 muestra el contenido de vitamina A en hígado de los grupos experimentales. Es conocido que el hígado es el principal sitio de almacenaje de la vitamina A, ingerida como tal o formada a partir de los carotenoides de la dieta (Batten *et al.*, 2004).

Tabla 15. Contenido de vitamina A en hígados en  $\mu\text{g/g}$ .

	Control	$\beta$ -caroteno	Sapotexantina	Criptocapsina
1	0.2	38.0	51.9	76.5
2	0.5	62.7	62.2	71.7
3	0.1	43.0	62.1	67.1
4	0.2	44.4	49.3	84.2
5	0.4	54.5	55.4	46.8
6	0.5	70.7	52.7	74.0
	$0.32 \pm 0.07^a$	$52.22 \pm 5.18^b$	$55.65 \pm 2.25^b$	$70.1 \pm 5.18^c$

Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar.

Letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 15 se puede observar que no existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de vitamina A hepática entre los grupos sapotexantina y  $\beta$ -caroteno, mientras el contenido de vitamina A en el hígado del grupo criptocapsina es significativamente mayor y en grupo control casi no acumula vitamina A. Estos resultados demuestran que la sapotexantina y criptocapsina poseen actividad provitamina A “*in vivo*”, tal como esperábamos, por la presencia de un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido en unos de los extremos de sus estructuras. Esta es la primera evidencia de que carotenoides con anillos  $\beta,\kappa$ , poseen actividad provitamina A “*in vivo*”.

Recientemente un grupo de investigadores demostró “*in vitro*” que la enzima BCO1, clonada del intestino humano, cataliza la transformación de sapotexantina y criptocapsina (carotenoides  $\beta,\kappa$ ) en vitamina A (Murillo *et al.*, 2014).

En el caso del  $\beta$ -Caroteno, diversos estudios han demostrado que esta molécula sufre una fragmentación en su parte central, entre los átomos de carbono 15 y 15', por acción de la enzima caroteno-15,15'-dioxigenasa y produciendo retinal como producto primario; este proceso ocurre en el intestino delgado y en menor proporción en el hígado (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Esta actividad enzimática fue encontrada por Olson y Hayaishi en 1965 en el hígado de la rata. Posteriormente, el retinal puede ser reducido a retinol o ser oxidado a ácido retinoico.

## 6.6. Separación e identificación de retinol en plasma.

La figura 18 muestra el cromatograma HPLC del patrón de retinol y del estándar interno junto a sus espectros de absorción UV-Vis. Las figuras 19 a la 22 muestran ejemplos de los cromatogramas HPLC y el espectro de absorción UV-Vis de retinol y el estándar interno de las muestras de plasma de los grupos control,  $\beta$ -Caroteno, sapotexantina y criptocapsina.

Como se observa, el procedimiento utilizado permite la clara identificación del retinol en el plasma, por el tiempo de retención y el espectro UV-Vis. En la figura 19 se observa que el plasma de las ratas del grupo control (sin carotenoide) contiene pequeñas cantidades de retinol, mientras que el plasma de los grupos alimentados con los carotenoides experimentales contiene mucho más retinol, esto era de esperar por los resultados observados en el hígado.

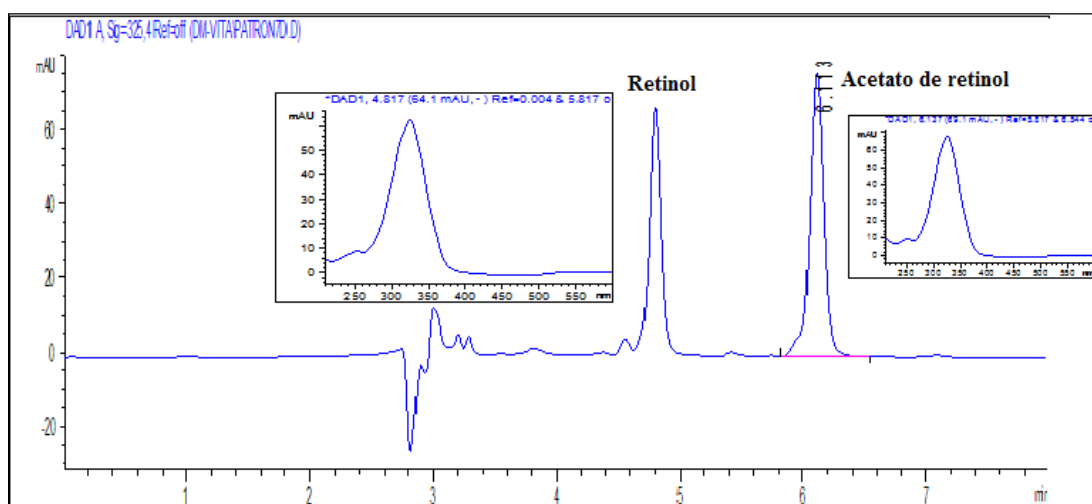


Figura 18. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de retinol y acetato de retinol (estándar).

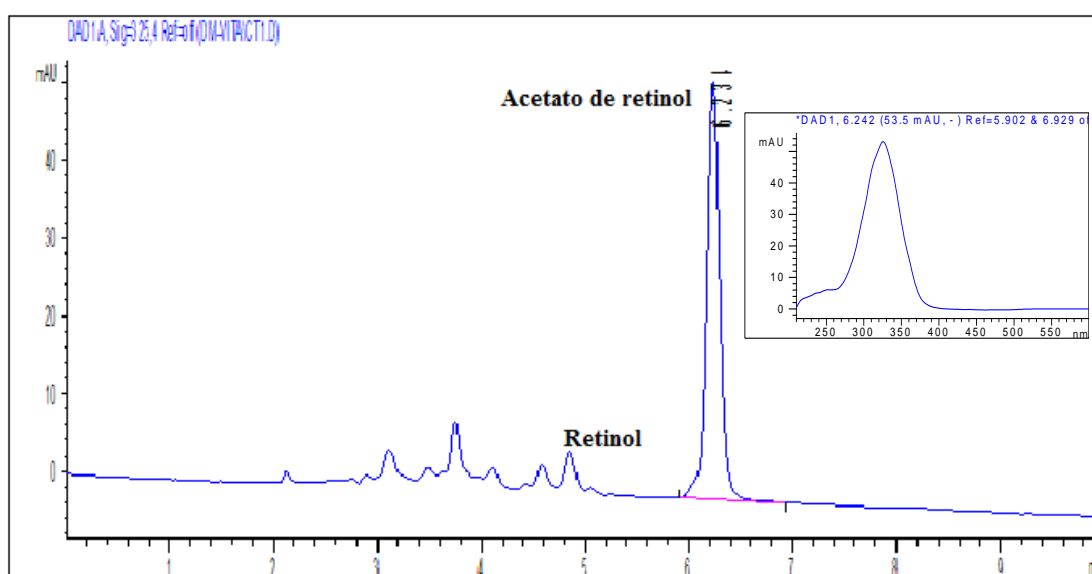


Figura 19. Cromatograma HPLC y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo control (plasma)

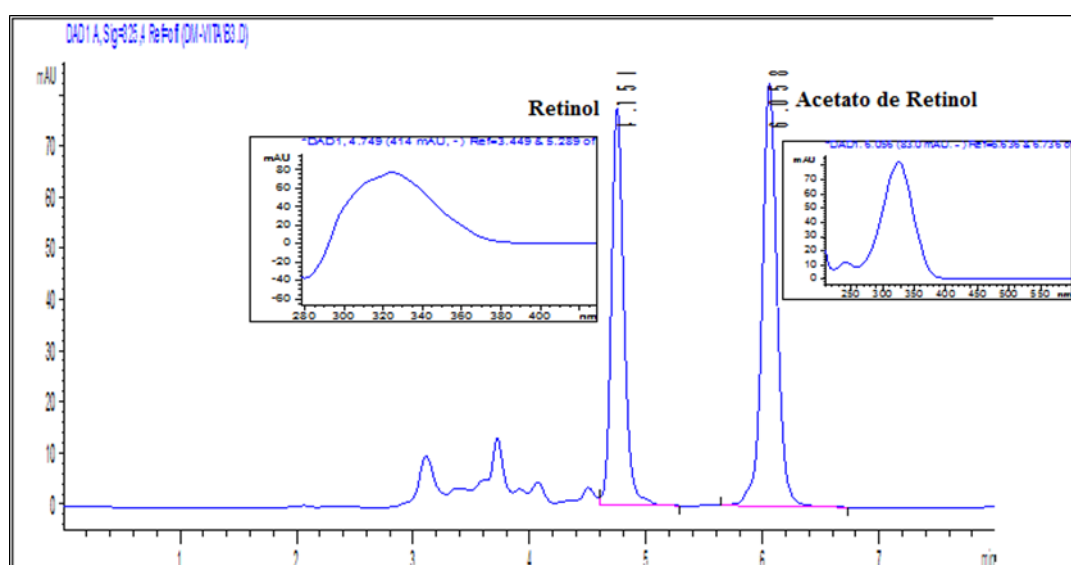


Figura 20. Cromatograma y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo  $\beta$ -Caroteno (plasma)

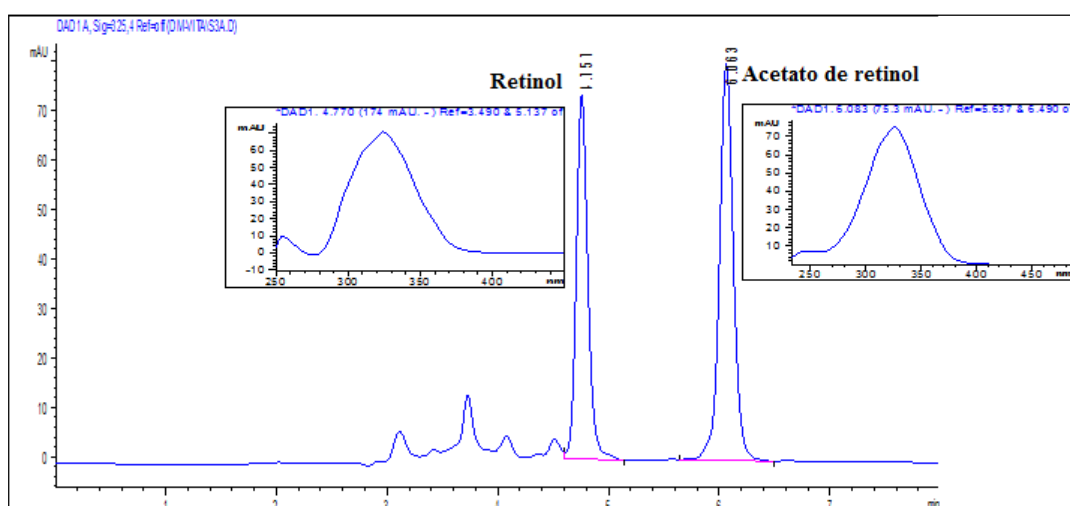


Figura 21. Cromatograma y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo sapotexantina (Plasma)

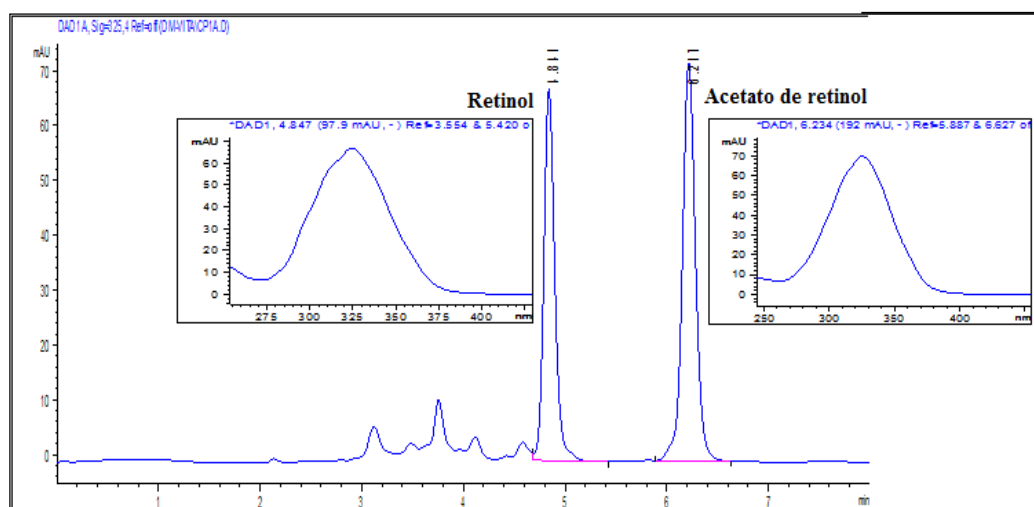


Figura 22. Cromatograma y espectro UV-Vis de los picos principales del grupo cryptocapsina (plasma)

## 6.7. Contenido de retinol en plasma

Tabla 16. Concentración de retinol en plasma en  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ .

	Control	$\beta$ -caroteno	Sapotexantina	Criptocapsina
<b>1</b>	2.2	18.2	15.1	21.8
<b>2</b>	1.7	16.6	19.0	17.1
<b>3</b>	2.4	21.4	21.1	22.8
<b>4</b>	3.1	13.9	18.4	20.0
<b>5</b>	2.2	17.4	19.6	21.4
<b>6</b>	1.8	17.2	22.4	18.0
	$2.2 \pm 0.2^b$	$17.45 \pm 0.99^a$	$19.27 \pm 1.02^a$	$20.18 \pm 0.92^a$

Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar.

Letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 16 se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de retinol plasmático de los grupos alimentados con los diferentes carotenoides, mientras en el grupo control el retinol plasmático es significativamente menor. El retinol plasmático es un reflejo del equilibrio con la del resto del organismo y por lo tanto un indicador del estado nutricional de vitamina A. A veces, aunque los niveles de vitamina A en hígado sean bajos, los plasmáticos pueden presentarse adecuados. En este caso los animales del grupo control demuestran estar deficientes de vitamina A.

## 6.8. Eficacia provitamina A de los carotenoides experimentales.

Utilizando los valores de consumo de carotenoides y de retinol depositado en el hígado, determinamos la eficacia de cada carotenoide para transformarse en vitamina A. Para esto, se divide la concentración de retinol en el hígado entre la cantidad de carotenoide consumida. En la tabla 17 se presenta el consumo de carotenoides y en la tabla 18 se presentan en forma integrada los promedios de concentración en plasma,

concentración en hígado y la eficacia calculada. Se puede observar que los tres carotenoides presentan la misma eficacia para transformarse en vitamina A. Los animales del grupo criptocapsina consumieron más carotenoide, pero también depositaron más vitamina A en el hígado.

Era de esperar que la eficacia de transformación de la sapotexantina y la criptocapsina fueran similares, ya que en ambas contiene una porción  $\beta$ -ionona en su estructura. Sin embargo, sorprende que el  $\beta$ -caroteno sea igual de eficiente ya que tiene dos porciones  $\beta$ -ionona y esperábamos cerca del doble de eficacia. Es posible que las oxigenasas que transforman los carotenoides en retinol sean más eficientes para transformar sapotexantina y criptocapsina que  $\beta$ -caroteno.

Tabla 17. Consumo de alimento y de carotenoides.

Grupo	Alimento (g)	Carotenoide (mg)
<b>Control</b>	$457.8 \pm 13.6^a$	0
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	$471.3 \pm 16.2^{a,b}$	$16.8 \pm 0.6^a$
<b>Sapotexantina</b>	$490.2 \pm 6.7^{a,b}$	$16.5 \pm 0.2^a$
<b>Criptocapsina</b>	$513.2 \pm 8.7^b$	$22.0 \pm 0.4^b$

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ error estándar.

Letras diferentes dentro de una columna, indican diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 18. Eficacia provitamina A de los carotenoides experimentales.

Grupo	Plasma ( $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ )	Hígado ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Eficacia
<b>Control</b>	$2.2 \pm 0.2^b$	$0.32 \pm 0.07^a$	-
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	$17.5 \pm 0.99^a$	$52.20 \pm 5.18^b$	$3.1 \pm 0.3^a$
<b>Sapotexantina</b>	$19.3 \pm 1.02^a$	$55.70 \pm 2.2^b$	$3.4 \pm 0.2^a$
<b>Criptocapsina</b>	$20.2 \pm 0.92^a$	$70.10 \pm 5.18^c$	$3.2 \pm 0.2^a$

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ error estándar.

Letras diferentes dentro de una columna, indican diferencias estadísticamente significativas.

## **6.9. Deposición de carotenoides en tejidos.**

En la tabla 19 se compara la deposición de los carotenoides experimentales en hígado. Se puede observar, que existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los grupos (letras diferentes). Los resultados demuestran que la sapotexantina es el carotenoide que más se acumula en el hígado, seguido por criptocapsina, aunque el grupo criptocapsina ingirió más carotenoides.

En la tabla 20 se compara la deposición de los carotenoides experimentales en tejidos extrahepáticos. En el caso de riñón, pulmón, corazón, bazo y músculo se extrajeron los carotenoides de un “pool”, de cada grupo. Por tal motivo no aparece información sobre la variabilidad. Se puede observar que la concentración de  $\beta$ -caroteno es mayor en riñón y el bazo, la de sapotexantina es mayor en el hígado y la de criptocapsina en el bazo. El conocimiento sobre la preferencia de carotenoides por ciertos tejidos puede ser de utilidad, para estudios de protección antioxidante selectiva de estos órganos, en estudios futuros.



Tabla 19. Contenido de carotenoides en hígado en µg/g.

	<b>Control</b>	<b>β-caroteno</b>	<b>Sapotexantina</b>	<b>Criptocapsina</b>
<b>1</b>	0.36	0.72	1.64	0.78
<b>2</b>	0.23	0.86	1.47	1.14
<b>3</b>	0.45	0.66	1.44	1.44
<b>4</b>	0.30	0.77	1.46	0.89
<b>5</b>	0.44	0.80	1.67	0.93
<b>6</b>	0.37	0.64	1.48	1.19
	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.10 <sup>d</sup>

Los resultados se expresan como promedios±error estándar.

Letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 20. Contenido de carotenoides en los tejidos en µg/g.

	<b>Control</b>	<b>β-caroteno</b>	<b>Sapotexantina</b>	<b>Criptocapsina</b>
<b>Riñón</b>	0.13	1.18	1.13	1.17
<b>Pulmón</b>	0.09	0.21	0.12	0.11
<b>Corazón</b>	0.25	0.42	0.31	0.24
<b>Bazo</b>	0.53	1.03	0.81	1.46
<b>Músculos</b>	0.01	0.06	0.04	0.07

Los carotenoides son constituyentes normales de la sangre y tejidos de algunas especies, lo cual probablemente se debe a que no todos estos compuestos se convierten eficientemente en vitamina A, y parte de ellos son absorbidos y depositados como carotenoides. La tasa de deposición de carotenoides en tejidos va a depender de la absorción selectiva a través de la pared intestinal, por una parte, y de su utilización y excreción por otra (Brenes-Soto., 2014).

## VII. CONCLUSIONES

Culminados los experimentos y analizados los resultados, la información obtenida nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- 1- Aislamos sapotexantina y criptocapsina del mamey en alta cantidad y pureza, para ensayos con ratas.
- 2- Utilizando  $\beta$ -caroteno como control, se demostró que criptocapsina y sapotexantina promueven la deposición de vitamina A en hígado, cuando son incluidos en la dieta.
- 3- Se observó que la eficacia de transformación, en vitamina A, de  $\beta$ -caroteno, sapotexantina y criptocapsina son similares.
- 4- Se observó que  $\beta$ -caroteno se acumula principalmente en el riñón, mientras que criptocapsina en el bazo y sapotexantina en el hígado.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Mejorar el proceso de investigación, ampliando los análisis experimentales para una mejora en la recolección de la información.

Extender dicha investigación a un nivel enzimático, estudiando los mecanismos de transformación de los carotenoides estudiados a vitamina A.

Se sugiere a las autoridades del país generar información sobre la composición nutricional de los alimentos disponibles para la población y sobre todos aquellos que brinden un aporte de vitamina A, debido a la gran importancia de este nutriente.

## VIX. BIBLIOGRAFÍA

1. ALLEN, O. J. y HAYAISHI, O. 1965. The enzymatic cleavage of  $\beta$ -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54: Washington, DC. pág 1364.
2. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr.* 1977; 107, pp. 1340-1348.
3. BACHMANN, H., DESBARATS, A y PATTISON, P. 2002, 'Feedback regulation of  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens' *J Nutr.* 132(12), págs. 3616-3622.
4. BATTEN, ML., IMANISHI, Y., MAEDA T., MOISE, AR., BRONSON, D, POSSIN, D., VAN GELDER, RN., BAEHR, W y PALCZEWSKI, K. 2004. Lecithin retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *Journal Biol Chem*; 279, págs. 10422-10432.
5. BENNASIR, H., SRIDHAR, S., TECH, M. y TAREK, T. 2010. Vitamin A. From Physiology To Disease Prevention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Volume 1, Issue 1, Article 014. Págs. 68-73
6. BRENES-SOTO, A. 2014. Dietary carotenoids in the animal organism, *Nutrición Animal Tropical* 8(1), ISSN: 2215-3527, págs. 21-29.
7. BRITTON, G. 1995. Carotenoids. Spectroscopy, volume 1B. Birkhäuser, Basel; Boston; Berlin, págs. 13 – 61
8. BRITTON, G., LIAAEN, S – JENSEN y PFANDER, H. 1995. Carotenoids, isolation and analysis, volume 1A. Birkhäuser, Basel; Boston; Berlin; págs. 17 – 138.
9. CARRILLO-LÓPEZ, A., YAHIA, E. M y RAMIREZ-PADILLA, G. K. 2010. Bioconversion of Carotenoids in Five Fruits and Vegetables to Vitamin A Measured by Retinol Accumulation in Rat Livers, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5 (2), ISSN 1557-4989, págs. 215-221.
10. CASTENMILLER, J.J.M Y WEST, C.E. 1998, Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition* 18, págs. 19- 38.
11. CAZZONELLI, CI y POGSON, BJ. 2010, Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15, doi:10.1016/ j.tplants.2010.02.003. págs. 266–274.
12. COLLERA-ZÚÑIGA, O., GARCÍA, FJ y MELÉNDEZ, RG. 2005. Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chem* 90. págs. 109–114.

13. D'AMBROSIO, D. N., CLUGSTON, R. D y BLANER, W. S. 2011. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*, 3; doi:10.3390/nu3010063, págs. 63-103.
14. DE PEE, S y WEST, CE. 1996, Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50 (3), págs. 38-53
15. DEMING, D., BOILEAU, M., THOMAS., HEINTZ, W., KASEY, H., CHRISTINE, A. Y ERDMAN, W.JR. 2002, 'Carotenoids: linking chemistry, absorption, and metabolism to potential roles in human health and disease', In *Handbook of antioxidants*. (2nd. ed). New York, USA: Marcel Dekker, Inc, págs. 747-751.
16. DÍAS, G.M., OLIVEIRA, L., CAMÕES, F.M., NUNES, B., VERSLOOT, P y HULSHOF, P.J.M. 2010, Critical Assessment of Three High Performance Liquid Chromatography Analytical Methods for Food Carotenoid Quantification. *Journal of Chromatography A* 1217 (21). págs. 3494-3502.
17. ELDAHSHAN, O.A y NASSER, A.B. 2013, Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*. Vol. 2, No 1. ISSN 2278-4136, págs. 225-234.
18. Erdman J.W., Bierer T.L., Gugger E.T. 1993, Absorption and transport of carotenoids. En: *Carotenoids in human health*. *Annals of the New York Academy of Science*, Vol. 691, pp 670-680.
19. FALLAH, E y PEIGHAMBARDoust, S. H. 2012. Validation of the Use of Dried Blood Spot (DBS) Method to Assess Vitamin A Status. *Health Promotion Perspectives*, 2(2), <http://doi.org/10.5681/hpp.021>, págs. 180-189.
20. FIEDOR, J y BURDA, K. 2014. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6; doi:10.3390/nu6020466, págs. 466-488.
21. FIERCE, Y., DE MORIAIS VIEIRA, M., PIANTEDOSI, R., WYSS, A., BLANER, W.S y PAIK, J. 2008. In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch. Biochem. Biophys*, 472, págs. 126–138.
22. GARCÍA-LÓPEZ, E., MORA IZAGUIRREL, M. O. 2012. Importance of the expression and activity of  $\beta$ -carotene 15, 15' monooxygenase and vitamin A. Its role in animal production. A Review. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, Vol. 20, Núm. 3-4, ISSN 1022-1301, págs. 95-112.
23. GELMAN, A. 2005, Analysis of variance –why it is More Important than Ever, *The Annals of Statistics* 2005, Vol. 33, No. 1, 1–53 DOI 10.1214/009053604000001048, págs. 1-53.
24. HARRISON, EH. 2005. Mechanisms of digestión and absorption of dietary vitamin A, *anual review of nutrition*, vol 25, doi: 10.1146, págs. 87-103.

25. HARRISON, EH y HUSSAIN MM. 2001 Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr*; 131, págs. 1405–1408
26. HOSOTANI, K. y KITAGAWA, M. 2003. Improved simultaneous determination method of  $\beta$ -carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. *J. Chromatogr. B.*, 791. DOI:10.1016/S1570 0232(03)00233-2. págs. 305-313.
27. International Vitamin a Consultative Group. 1982. Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. IVACG editors.
28. Kim, Y. S. y D. K. Oh. 2010. Biotransformation of carotenoids to retinal by carotenoid 15,15-oxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88(4). págs. 807.
29. Kim, Y. S. y D. K. Oh. 2009. Substrate specificity of recombinant chicken beta-carotene 15, 15'-monooxygenase that converts beta-carotene into retinal. *Biotechnol. Lett.* 31. págs. 403.
30. Kostic, D., White, WS y Olson, JA. 1995, Intestinal absorption. Serum clearance and interactions between lutein and  $\beta$ -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, págs. 604-610.
31. L JEYANTHI, R., SHARMILA, S., PAUL, M. y SESHIAH, C. 2014, Extraction and Purification of Carotenoids from vegetables. *J. Chem. Pharm. Res.* 6(4) págs. 594-598.
32. LACRAMIOARA, E., CROITORU, O., COMAN, G, SIMONA, C., TUTUNARU, D y CUCIUREANU, R. 2014. Validation of HPLC method for the determination of retinol in different dietary supplements. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 19, No. 6.
33. LEUENBERGER, M. G., ENGELCH-JARRET, C y WOGGON, W.D. 2001. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of  $\beta$ -carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40(14). pág. 2613.
34. LIETZ, G., LANGE, J Y RIMBACH, G. 2010. Molecular and dietary regulation of  $\beta$ -carotene 15,15'-mono-oxygenase 1 (BCMO1). *Arch. Biochem. Biophys.* 502. pág. 8.
35. LINDQVIST, A. y ANDERSSON, S. 2002. Biochemical properties of purified recombinant human  $\beta$ -carotene 15, 15' monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277. págs. 23942.
36. MÁRQUEZ, C. E., YÉPEZ-NARANJO, R.S y RINCÓN, M. 2002, Basic concepts and determination of antioxidants vitamins E and A, *Invest Clin* 43(3), págs. 191-204.
37. McGraw KJ, Toomey MB. 2010, Carotenoid accumulation in the tissues of zebra finches: predictors of integumentary pigmentation and implications for carotenoid allocation strategies. *Physiological and Biochemical Zoology* 83. doi:10.1086/648396. pp 97-109.

38. MÍNGUEZ, MI., PÉREZ-GÁLVEZ, A y HORNERO, D. 2006. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales. CTC Alimentación 26. págs. 108- 113.
39. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A., VICARIO, IM Y HEREDIA, FJ. 2007. Carotenoid pigments: structural and physicochemical considerations, Arch Latinoam Nutr. 57(2), págs. 109-117.
40. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, AJ., VICARIO, IM y HEREDIA, FJ .2004. Stability of carotenoid pigments in foods, Arch Latinoam Nutr. ;54(2), págs. 15.-209
41. MORA, I. O. y SHIMADA, A. 2001. Causas de color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. Vet. Mex. 32(1). pág. 63.
42. MURILLO, E., MCLEAN, R Y BRITTON, G. 2011, ‘Sapotexanthin, an A-provitamin carotenoid from red mamey (*Pouteria sapota*)’, J Nat Prod. 25; 74(2), págs. 283-5.
43. MURILLO, E., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A J. y PORTUGAL, F. 2010. ‘Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin’. Food Chemistry.122 (1): págs. 167-172.
44. MURILLO, E., REYNA, G., DELA SEÑA, C and HARRISON, E.H. 2014. Provitamin A activity of  $\beta$ - $\kappa$  carotenoids, using purified recombinant human of  $\beta$ -carotene15,15'-oxygenase (BCO1), 17-International Symposium on Carotenoids, April, Salt Lake, Utah, USA.
45. MURILLO, E., TURCSI, E., SZABÓ, I., MOSQUERA, Y., AGÓCS, A., NAGY, V., GULYÁS-FEKETE, Y DELI, J. 2016, Carotenoid Composition of the Fruit of Red Mamey (*Pouteria sapota*), J. Agric. Food Chem, 64 (38), págs. 7148–7155.
46. NAGAO, A., DURING, A., HOSHINA, C., TERAOKA, J y OLSON, JA, 1997, ‘Stoichiometric conversion of all trans- $\beta$ -carotene to retinal by pig intestinal extract’, Arch. Biochem. Biophys., vol. 328, págs. 57–63.
47. NAMITHA, KK y NEGI, PS. 2010, ‘Chemistry and Biotechnology of Carotenoids’, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 50, págs. 728–760.
48. OLIVER, J y PALOU, A. Chromatographic Determination of Carotenoids in Foods. 2000, Journal of Chromatography A 881 (1-2) págs. 543-555.
49. OLSON, JA y HAYAISHI, O. 1965. ‘The enzymatic cleavage of  $\beta$ -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine’, Proc. Natl. Acad.Sci., vol. 54, págs. 1364–1370.

50. OLSON, J. A. 1989, 'Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of  $\beta$ -Carotene into Vitamin A', J Nutr. 119(1), págs. 105-108.
51. PARKER, R.S. 1997, Bioavailability of carotenoids. European Journal of Clinical Nutrition 51: S86-S90, págs. 85-90.
52. PARKER, R. 1996, Absorption metabolism and transport of carotenoids. The FASEB Journal 10, págs. 542-551.
53. RAO, A.V y RAO, L.G. 2007. Carotenoids and human health. Pharmacological Research 55. doi: 10.1016/j.phrs.01.012. págs. 207-216.
54. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods, Washington, D.C. ILSI Press; págs. 14 – 44.
55. RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B., RODRÍGUEZ, E.B y AMAYA-FARFÁN, J. 2006, Advances in Food Carotenoids Research: Chemical and Technological Aspects, Implications in Human Health. Mal J Nutr 12(1), págs. 101-121.
56. RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B. y KIMURA, M. 2004. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus Technical Monograph Series. 2. Washington D. C., USA: International Food Policy Research Institute (IFPRI) - Cali, Colombia: International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
57. RUBIO HURTADO, M.J. y BERLANGA SILVENTE, V. 2012. Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas T de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. REIRE. Revista d'Innovació i Recerca en Educació, 5(2). págs. 83-100.
58. SANDER, L., SHARPLESS, K y PURSCH, M. 2000, C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 880. Págs. 189-202.
59. SCHIEDT, K., LEUENBERGER, FJ., VECCHI, M y GLINZ, E. 1985, Absorption, retention and metabolic transformation of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. Pure and Applied Chemistry. 57(5), págs. 685-692.
60. SHINTANI, H. 2013. HPLC Analysis of Vitamin A and Carotenoids. Pharmaceut Anal Acta 4: 218. doi:10.4172.1000218 págs. 2153-2435.
61. SOMMER, A. 2008. Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview. J Nutr. 138. págs. 1835-9
62. TAYLOR, L.K., BRACKENRIDGE, A., VIVIER. M. A y OBERHOLSTER, A. 2006, High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in Arabidopsis thaliana leaf tissue. Journal of Chromatography A, 1121. págs. 83–91.
63. VANVLIET, 1996, Absorption of  $\beta$ -carotene and other carotenoids in humans and animal models. European Journal of Clinical Nutrition 50 (suppl 3), págs. 32-37



64. VON, L, J. 2010. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 30:35.
65. WYSS, A. 2004. Carotene oxygenases: A new family of double bond cleavage enzymes. *J. Nutr.* 134(1). págs. 246.